

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE 2015/2016

**UTILIZAÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS DA ORLA COSTEIRA COMO
BIOAMOSTRADORES DE ACUMULAÇÃO DE FILTROS-UV E MUSKS
SINTÉTICOS**

HUGO FILIPE DIAS RIBEIRO

Dissertação submetida para obtenção do grau de

MESTRE EM ENGENHARIA DO AMBIENTE

Presidente do Júri: Cidália Maria de Sousa Botelho
(Professora Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de
Engenharia da Universidade do Porto)

Orientador académico: Lúcia Maria da Silveira Santos
(Professora Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de
Engenharia da Universidade do Porto)

Coorientador académico: Vera Maria Ferreira da Cruz Homem
(Investigadora Pós-Doutoramento do Departamento de Engenharia Química da
Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto)

Julho, 2016

Agradecimentos

Porque sem os recursos a que tive acesso este trabalho não seria possível, um grande agradecimento ao LEPABE (Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia) e ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Os meus agradecimentos destinam-se também à minha orientadora Professora Doutora Lúcia Santos, por me conseguir cativar para este tema e por se demonstrar sempre disponível e ter dado toda a confiança para que esta dissertação desse certo, apoiando-me sempre com grande simpatia.

À minha coorientadora Professora Doutora Vera Homem, quero agradecer por todo o apoio científico e tempo despendido comigo e com este trabalho, sentindo-me honrado por me ter orientado com grande empenho até ao fim, possibilitando que esta tese contenha o menor número de erros possível e com que sinta orgulho no trabalho efetuado.

Para a Engenheira Sara Ramos, um agradecimento é pouco, para todo o trabalho que teve com esta dissertação e principalmente em me “aturar”, mostrando-se sempre disponível e preocupada com o meu trabalho.

Para todas as pessoas que fazem parte do laboratório E201, quero agradecer por manterem sempre um ambiente de grande integração e de bem-estar, mostrando-se sempre disponíveis para me ajudarem, fazendo deste laboratório com certeza um dos melhores locais de trabalho que conheço. Ao meu companheiro de jornada, Rodrigo Soares, agradeço por juntos mantermos a nossa “sanidade mental”. A todos os restantes companheiros de tese neste laboratório, agradeço por serem pessoas fantásticas e proporcionarem também um grande ambiente no laboratório, em especial à Paula Penêda por partilhar esta etapa comigo para além dos 5 anos de curso.

A todos os meus amigos não há palavras para agradecer toda a caminhada efetuada ao longo de cinco anos. Tenho a agradecer a todos os que partilharam comigo os dias de trabalho para a tese e por me motivarem todos os dias a chegar ao objetivo final.

Por último, mas não menos importantes, aos meus pais, Manuel Dias e Alzira Moreira, e ao meu irmão, Tiago Ribeiro, por tudo o que foram até hoje.

Este trabalho foi financiado pelos projetos POCI-01-0145-FEDER-006939 - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia - LEPABE e NORTE-01-0145-FEDER-000005 - LEPABE-2-ECO-INNOVATION, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e Programa Operacional Regional do Norte (NORTE2020) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.



Resumo

Devido ao crescimento da indústria cosmética e a um maior consumo dos seus bens, produtos de cuidado pessoal (PCPs) têm surgido com maior frequência no meio ambiente, como contaminantes de preocupação emergente. Incluídos nesta categoria estão os *musks* sintéticos e os filtros-UV. Os *musks* sintéticos são fixadores de fragrâncias ou aditivos enquanto os filtros-UV são ingredientes ativos nos protetores solares e têm como função filtrar a radiação UV. Tanto quanto é do conhecimento do autor não há estudos que tenham detetado estes compostos nas espécies vegetais da orla costeira.

Este trabalho teve como objetivo principal verificar se espécies vegetais da orla costeira têm a capacidade de acumular 5 *nitromusks* (*musks ambrette*, *xylene*, *ketone*, *moskene* e *tibetene*), 5 *musks* policíclicos (*cashmeran*, *celestolide*, *phantolide*, *galaxolide* e *tonalide*), 2 *musks* macrocíclicos (*exaltolide* e *ethylene brassylate*) e 4 filtros UVB orgânicos (4-MBC, EDP, EMC e OC), funcionando como bioamostradores. Para tal, analisaram-se 42 amostras de 5 espécies diferentes de plantas dunares (eruca, chorão, morganheira, luzerna e feno), recolhidas em 15 praias diferentes dos concelhos de Matosinhos e Vila Nova de Gaia, em Portugal.

A extração destes compostos foi efetuada com o método de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) com condições previamente desenvolvidas no laboratório: 2,5 g de amostra, 10 mL de diclorometano/hexano (1:1), primeiro QuEChERS com 6 g de MgSO₄ e 1,5 g de NaCHCOO₃ e segundo QuEChERS com 900 mg de MgSO₄, 300 mg de PSA e 150 mg de C₁₈. Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

A validação do método analítico foi efetuada com a utilização de 7 níveis de concentração diferentes para os padrões de calibração (10-1000 µg/L). As recuperações obtidas rondaram os 93% e os coeficientes de variação foram geralmente inferiores a 15%. Os limites de deteção variaram entre 0,003 ng/g (*ethylene brassylate*) e 1,32 ng/g (*musk ambrette*).

Foram detetados *musks* e filtros-UV em todas as amostras analisadas, com as amostras de chorão a serem as mais propensas a acumularem *musks* e a morganheira filtros-UV. As plantas com maior teor em água acumularam maiores concentrações de *musks*. O *musk* mais frequentemente detetado foi o *ethylene brassylate* e o filtro-UV mais frequente o EMC. O *ethylene brassylate* foi o *musk* detetado em maior concentração (336 ng/g dw) na amostra de chorão da praia de Canide Norte e o filtro-UV EMC com uma concentração de 8899 ng/g dw na morganheira de Sãozinha. As praias com níveis mais elevados de *musks* foram Angeiras Norte e Canide Norte e com níveis maiores de filtros-UV a praia de Sãozinha. As plantas analisadas podem ser usadas como bioamostradores.

Palavras-chave: *musks* sintéticos, filtros-UV, espécies vegetais da orla costeira, QuEChERS, GC-MS

Abstract

Due to the growth of the cosmetics industry and the increased consumption of its goods, personal care products (PCPs) has appeared more frequently in the environment, as emerging contaminants. Included in this category are synthetic musks and UV-filters. Synthetic musks are fragrances fixers or additives whereas UV-filters are active ingredients in sunscreens and have the function to filter UV radiation. By the author's best knowledge, no studies have detected these compounds in plant species of the coastline.

This study aimed to verify whether coastline plant species have the ability to accumulate 5 nitromusks (musks ambrette, xylene, ketone, moskene and tibetene), 5 polycyclic musks (cashmeran, celestolide, phantolide, galaxolide and tonalide), 2 macrocyclic musks (exaltolide and ethylene brassylate) and 4 organic UVB filters (4-MBC, EDP, EMC and OC), functioning as biosamplers. To this end, were analyzed 42 samples of 5 different species of dune plants (european searocket, hottentot-fig, sea spurge, sea medick and sand couch-grass), collected in 15 different beaches of the municipalities of Matosinhos and Vila Nova de Gaia, Portugal.

The extraction of these compounds was made using the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) previously developed in the laboratory: 2.5 g of sample, 10 mL of dichloromethane/hexane (1:1), first QuEChERS with 6 g of MgSO_4 and 1.5 g of NaHCO_3 and second QuEChERS with 900 mg of MgSO_4 , 300 mg of PSA and 150 mg of C_{18} . The extracts were analyzed by coupled gas chromatography mass spectrometry.

The validation of the analytical method was performed using 7 different concentration levels for the calibration standards (10-1000 g/L). The recoveries obtained were around 93% and relative standard deviation were generally less than 15%. Detection limits ranged from 0.003 ng/g (ethylene brassylate) and 1.32 ng/g (musk ambrette).

Were detected musks and UV-filters in all samples, with samples of hottentot-fig to be the most likely to accumulate musks and sea spurge the UV-filters. Plants with higher water content accumulate higher concentrations of musks. The musk most frequently detected was the ethylene brassylate and the most common UV-filter was EMC. The musk ethylene brassylate was detected in higher concentrations (336 ng/g dw) in weeping of sample North Canide beach and UV-filter EMC with a concentration of 8899 ng/g dw of the sea spurge of Sãozinha beach. The beaches with higher levels of musks were North Angeiras and North Canide and with higher levels of UV-filters the beach of Sãozinha. The plants analysed can be used as biosamplers.

Keywords: synthetic musks, UV-filters, plant species of the coastline, QuEChERS, GC-MS

Declaração

O autor declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Índice

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Introdução | 1 |
| 1.1 | Enquadramento e apresentação do projeto | 1 |
| 1.2 | <i>Musks</i> sintéticos | 3 |
| 1.2.1 | <i>Nitromusks</i> | 3 |
| 1.2.2 | <i>Musks</i> policíclicos..... | 5 |
| 1.2.3 | <i>Musks</i> macrocíclicos | 6 |
| 1.2.4 | <i>Musks</i> alicíclicos | 8 |
| 1.3 | Filtros-UV..... | 8 |
| 1.3.1 | Filtros UVA orgânicos | 10 |
| 1.3.2 | Filtros UVB orgânicos | 10 |
| 1.3.3 | Filtros UVA/UVB orgânicos..... | 12 |
| 1.4 | Espécies vegetais da orla costeira..... | 13 |
| 1.5 | Métodos analíticos para a determinação de filtros-UV e <i>musks</i> na vegetação | 16 |
| 1.5.1 | Técnicas de extração e <i>clean-up</i> | 16 |
| 1.5.2 | Método instrumental..... | 20 |
| 2 | Estado da arte | 23 |
| 2.1 | Determinação de <i>musks</i> em espécies vegetais | 23 |
| 2.2 | Determinação de filtros-UV em espécies vegetais | 30 |
| 3 | Descrição técnica | 33 |
| 3.1 | Reagentes | 33 |
| 3.2 | Preparação das soluções padrão | 33 |
| 3.3 | Amostragem..... | 34 |
| 3.4 | Extração e <i>clean-up</i> | 36 |
| 3.5 | Instrumentação..... | 37 |
| 3.6 | Controlo da qualidade | 38 |
| 3.7 | Gestão de resíduos | 38 |
| 4 | Resultados e discussão | 39 |
| 4.1 | Estudo preliminar do efeito do solvente no método de extração | 39 |
| 4.2 | Validação do método analítico | 40 |
| 4.3 | Teor em água e teor lipídico das espécies vegetais | 44 |
| 4.4 | <i>Musks</i> sintéticos nas espécies vegetais da orla costeira | 44 |
| 4.5 | Filtros-UV nas espécies vegetais da orla costeira | 51 |
| 5 | Conclusões..... | 57 |
| 6 | Limitações e trabalho futuro | 59 |
| | Referências | 61 |
| Anexo 1 | - Propriedades dos filtros-UV orgânicos | 73 |
| Anexo 2 | - Plantas dunares de Matosinhos e Gaia | 79 |

| | | |
|---------|------------------------------|----|
| Anexo 3 | - Curvas de calibração | 83 |
| Anexo 4 | - Cromatogramas | 89 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 - Estrutura de uma planta espermatófito e principais transferências entre compartimentos ambientais (adaptado de (PIER, 2013)). | 14 |
| Figura 1.2 - Geomorfologia de um sistema dunar (adaptado de (Geira, 2016)). | 15 |
| Figura 1.3 - Diagrama processual do GC-MS. | 20 |
| Figura 1.4 - Diagrama do funcionamento de um analisador de massa <i>ion trap</i> . | 22 |
| Figura 3.1 - Localização no Grande Porto das praias onde decorreram amostragens. | 36 |
| Figura 3.2 - Procedimento de QuEChERS utilizado neste estudo. | 37 |
| Figura 4.1 - Resultado dos testes de recuperação para os solventes DCM/Hex (1:1) e ACN nas diferentes espécies vegetais. | 39 |
| Figura 4.2 - Níveis de concentração total dos <i>musks</i> detetados nas amostras. | 46 |
| Figura 4.3 - Frequências de deteção médias de cada <i>musk</i> sintético nas diferentes espécies vegetais. Distribuição dos <i>musks</i> detetados: A - no chorão; B - no feno; C - na luzerna; D - na morganheira; E - na eruca. | 47 |
| Figura 4.4 - Representação da variação da concentração total dos <i>musks</i> detetados nas praias com a distância à ETAR mais próxima. | 48 |
| Figura 4.5 - Representação da variação da concentração total dos <i>musks</i> detetados em cada planta com o número de utilizadores das praias na época balnear. | 48 |
| Figura 4.6 - Níveis de concentração total dos filtros-UV detetados nas amostras. | 52 |
| Figura 4.7 - Frequências de deteção médias de cada filtro-UV nas diferentes espécies vegetais. Distribuição dos filtros-UV detetados: A - no chorão; B - no feno; C - na luzerna; D - na morganheira; E - na eruca. | 53 |
| Figura 4.8 - Representação da variação da concentração total dos filtros-UV detetados nas praias com a distância à ETAR mais próxima. | 54 |
| Figura 4.9 - Representação da variação da concentração total dos filtros-UV detetados em cada planta com o número de utilizadores das praias na época balnear. | 54 |
| Figura A2.1 - Imagens das plantas dunares de Matosinhos e Vila Nova de Gaia (Gomes <i>et al.</i> , 2002). | 81 |
| Figura A3.1 - Curva de calibração do <i>musk cashmeran</i> . | 83 |
| Figura A3.2 - Curva de calibração do <i>musk celestolide</i> . | 83 |
| Figura A3.3 - Curva de calibração do <i>musk phantolide</i> . | 84 |
| Figura A3.4 - Curva de calibração do <i>musk exaltolide</i> . | 84 |
| Figura A3.5 - Curva de calibração do <i>musk ambrette</i> . | 84 |
| Figura A3.6 - Curva de calibração do <i>musk galaxolide</i> . | 85 |
| Figura A3.7 - Curva de calibração do <i>musk xylene</i> . | 85 |
| Figura A3.8 - Curva de calibração do <i>musk tonalide</i> . | 85 |
| Figura A3.9 - Curva de calibração do <i>musk moskene</i> . | 86 |

| | |
|--|----|
| Figura A3.10 - Curva de calibração do <i>musk tibetene</i> | 86 |
| Figura A3.11 - Curva de calibração do <i>musk ketone</i> | 86 |
| Figura A3.12 - Curva de calibração do <i>musk ethylene brassylate</i> | 87 |
| Figura A3.13 - Curva de calibração do filtro-UV 4-MBC. | 87 |
| Figura A3.14 - Curva de calibração do filtro-UV EDP. | 87 |
| Figura A3.15 - Curva de calibração do filtro-UV EMC..... | 88 |
| Figura A3.16 - Curva de calibração do filtro-UV OC. | 88 |
| Figura A4.1 - Cromatograma em modo SIS do padrão de calibração a 750 µg/L. | 89 |
| Figura A4.2 - Cromatograma em modo SIS da amostra de eruca. | 90 |
| Figura A4.3 - Cromatograma em modo SIS da amostra de eruca com <i>spike</i> de 45 ng/g. | 91 |
| Figura A4.4 - Cromatograma em modo SIS da amostra de chorão. | 92 |
| Figura A4.5 - Cromatograma em modo SIS da amostra de chorão com <i>spike</i> de 45 ng/g. | 93 |
| Figura A4.6 - Cromatograma em modo SIS da amostra de morganheira. | 94 |
| Figura A4.7 - Cromatograma em modo SIS da amostra de morganheira com <i>spike</i> de 45 ng/g. | 95 |
| Figura A4.8 - Cromatograma em modo SIS da amostra de luzerna. | 96 |
| Figura A4.9 - Cromatograma em modo SIS da amostra de luzerna com <i>spike</i> de 45 ng/g. | 97 |
| Figura A4.10 - Cromatograma em modo SIS da amostra de feno. | 98 |
| Figura A4.11 - Cromatograma em modo SIS da amostra de feno com <i>spike</i> de 45 ng/g. | 99 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas dos principais <i>nitromusks</i> | 4 |
| Tabela 1.2 - Propriedades físico-químicas dos principais <i>musks</i> policíclicos..... | 6 |
| Tabela 1.3 - Propriedades físico-químicas dos <i>musks</i> macrocíclicos | 7 |
| Tabela 1.4 - Propriedades físico-químicas dos <i>musks</i> alicíclicos..... | 8 |
| Tabela 1.5 - Propriedades físico-químicas de alguns dos filtros UVB orgânicos mais comuns no mercado | 12 |
| Tabela 2.1 - Sumário de parâmetros dos métodos analíticos usados para a determinação de <i>musks</i> em espécies vegetais | 27 |
| Tabela 2.2 - Sumário de parâmetros dos métodos analíticos usados para a determinação de filtros-UV em espécies vegetais | 32 |
| Tabela 3.1 - Caraterísticas das espécies vegetais recolhidas..... | 34 |
| Tabela 3.2 - Caraterísticas dos locais de amostragem..... | 36 |
| Tabela 3.3 - Iões quantificadores e qualificadores e tempos de retenção de cada composto analisado no GC-MS..... | 38 |
| Tabela 4.1 - Parâmetros de linearidade para a determinação de <i>musks</i> e filtros-UV | 41 |
| Tabela 4.2 - Resultados referentes a estudos de precisão e exatidão do método analítico utilizado | 42 |
| Tabela 4.3 - Valores dos teores de água e de lípidos das cinco plantas recolhidas (%) | 44 |
| Tabela 4.4 - Concentrações dos <i>musks</i> sintéticos nas amostras de plantas recolhidas (ng/g em peso seco)..... | 45 |
| Tabela 4.5 - Resumo dos resultados obtidos para os <i>musks</i> com as concentrações em ng/g de peso seco..... | 49 |
| Tabela 4.6 - Concentrações dos filtros-UV em todas as amostras de plantas em ng/g de peso seco | 51 |
| Tabela 4.7 - Resumo dos resultados obtidos para os filtros-UV com as concentrações em ng/g de peso seco | 55 |
| Tabela A1.1 - Propriedades físico-químicas dos filtros-UV permitidos nos cosméticos pela UE | 73 |
| Tabela A1.2 - Propriedades físico-químicas dos filtros-UV orgânicos banidos dos produtos cosméticos na UE | 76 |
| Tabela A2.1 - Caraterísticas da flora dunar de Matosinhos e Gaia (Correia & Fidalgo, 1995; Parque Biológico de Gaia, 2005) | 79 |
| Tabela A3.1 - Parâmetros de avaliação das curvas de calibração | 88 |

Notação e Glossário

Nomenclatura

| | | |
|------------------|--------------------------------------|-------|
| BCF | Fator de bioconcentração | L/kg |
| Conc. | Concentração | ng/g |
| DL ₅₀ | Dose Letal mediana | mg/kg |
| K _{ow} | Coeficiente de partilha octanol-água | |
| m | Massa | g |
| M | Massa molecular | g/mol |
| PE | Ponto de ebulição a 760 mmHg | °C |
| s | Solubilidade em água a 25 °C | mg/L |
| T | Temperatura | °C |
| v | Volume | mL |

Abreviaturas

| | |
|-------------------|---|
| 234THB | 2,3,4-Tri-hidroxibenzofenona |
| 244THB | 2,4,4'-Tri-hidroxibenzofenona |
| 2DHB | 2,2'-Di-hidroxibenzofenona |
| 2HB | 2-Hidroxibenzofenona |
| 3BC | Cânfora de 3-benzilideno |
| 3HB | 3-Hidroxibenzofenona |
| 4-MBC | Cânfora de 3-(4'-metilbenzilideno) |
| 4DHB | 4,4'-Di-hidroxibenzofenona |
| 4HB | 4-Hidroxibenzofenona |
| 4PB | 4-Fenilbenzofenona |
| a | Declive |
| ADBI | <i>Musk celestolide</i> |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AHMI | <i>Musk phantolide</i> |
| AHTN | <i>Musk tonalide</i> |
| ASE | <i>Accelerated Solvent Extraction</i> (Extração acelerada por solvente) |
| ATII | <i>Musk traseolide</i> |
| b | Ordenada na origem |
| BCSA | Ácido sulfónico de cânfora de benzilideno |
| BEMT | Bis-etil-hexiloxifenol metoxifenol triazina |
| BH | (Benzidrol) difenilmetanol |
| BMDM | 4- <i>terc</i> -butil 4'-metoxidibenzoilmetano |
| BP | Benzofenona |
| BP1 | 2,4-Di-hidroxibenzofenona |
| BP2 | 2,2',4,4'-Tetra-hidroxibenzofenona |
| BP3 | 2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona |
| BP4 | 2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-ácido sulfónico |
| BP5 | 2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfonato de sódio |
| BP8 | 2,2'-Di-hidroxi-4-metoxibenzofenona |
| BP10 | 2-Hidroxi-4-metoxi-4'-metilbenzofenona |
| BP12 | 2-Hidroxi-4-octiloxibenzofenona |
| BT | 1- <i>H</i> -benzotriazol |
| BT-d ₄ | 1- <i>H</i> -benzotriazol-d ₄ |

| | |
|-----------------|---|
| BZS | Salicilato de benzilo (Benzil-hidroxibenzoato) |
| C ₁₈ | Sílica trifuncional polimericamente ligada |
| CAS# | Número da <i>Chemical Abstract Service</i> |
| CBM | Metassulfato de cânfora de 3-(4'-benzilideno aquilamónio) |
| CE | Comissão Europeia |
| Ch | Chorão |
| CI | Ionização química |
| CIBT | 5-Clorobenzotriazol |
| CLP | Classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas |
| CV | Coeficiente de Variação |
| DBT | Dietil-hexil butamido triazina |
| DCM | Diclorometano |
| DEP | Dietilftalato |
| DHHB | 2-(4'-Dietilamino-2'-hidroxibenzoil)-benzoato de hexilo |
| DPDT | Disódio fenil dibenzimidazol tetrasulfonato |
| DPMI | <i>Musk cashmeran</i> |
| DTS | Drometrizol trisiloxano |
| dw | <i>Dry weight</i> (Peso seco) |
| EB | <i>Musk ethylene brassylate</i> |
| EDP | Benzoato de 2-etil-hexil 4-dimetilamino |
| EI | Ionização eletrónica |
| EHT | Etil-hexil triazona |
| EMC | 4-Metoxicinamato de 2-etil-hexilo |
| Er | Eruca-marinha |
| ES | Salicilato de 2-etil-hexilo |
| Et-PABA | Etil 4-aminobenzoato (etil-PABA) |
| ETAR | Estação de Tratamento de Águas Residuais |
| EXA | <i>Musk exaltolide</i> |
| Fe | Feno-das-areias |
| GC | Cromatografia Gasosa |
| GCB | <i>Graphitized Carbon Black</i> |
| GPC | <i>Gel permeation chromatography</i> (Cromatografia de permeação de gel) |
| Hex | <i>n</i> -hexano |
| HHCB | <i>Musk galaxolide</i> |
| HLB | Hidrofílico-lipofílico-equilibrado |
| HMS | Salicilato de 3,3,5-trimetilciclo-hexilo |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| IMC | 4-Metoxicinamato de isoamilo |
| LC | Cromatografia líquida |
| LD | Limite de Detecção |
| LOAEL | Nível mínimo em que se observa efeitos adversos no ambiente |
| LQ | Limite de Quantificação |
| Lu | Luzerna-das-praias |
| MA | <i>Musk ambrette</i> |
| MBBT | Metileno bis-benzotriazolil tetrametil butilfenol |
| MK | <i>Musk ketone</i> |
| MM | <i>Musk moskene</i> |
| Mo | Morganheira-das-praias |
| MS | Espectrometria de Massa |
| MSPD | <i>Matrix Solid Phase Dispersion</i> (dispersão da matriz em fase sólida) |
| MT | <i>Musk tibetene</i> |

| | |
|----------------|---|
| MX | <i>Musk xylene</i> |
| nd | Não detetado |
| ni | Não indicado |
| OC | 2-Ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etil-hexilo (octocrileno) |
| ODP | Octildimetil-ácido <i>p</i> -aminobenzóico |
| PABA | Ácido <i>p</i> -aminobenzóico |
| PCP | Produtos para Cuidados Pessoais |
| PBSA | Ácido sulfónico de 2-fenil-5-benzimidazol |
| PDMS | Polidimetilsiloxano |
| PEG-25 PABA | Etoxilado etil-4-aminobenzoato |
| PLE | <i>Pressurized Liquid Extraction</i> (Extração com líquido pressurizado) |
| PSA | Polímero contendo na sua estrutura uma amina primária e secundária |
| PTFE | Politetrafluoretileno |
| PVDF | Fluoreto de polivinilideno |
| QuEChERS | <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> (Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) |
| r | Coeficiente de correlação |
| Rec | Recuperação |
| s _a | Desvio-padrão do declive |
| s _b | Desvio-padrão da ordenada na origem |
| SBSE | <i>Stir-Bar Sorptive Extraction</i> (Extração por sorção numa barra de agitação) |
| SD | Média das análises em duplicado |
| SFE | <i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extração com fluido supercrítico) |
| si | Sem informação |
| SIS | <i>Selected ion storage</i> (armazenamento dos iões selecionados) |
| SPE | <i>Solid Phase Extraction</i> (Extração da fase sólida) |
| SPME | <i>Solide Phase Microextraction</i> (Microextração da fase sólida) |
| TD | Dessorção térmica |
| TDSA | Ácido sulfónico de dicânfora de tereftalideno (Ecamsule) |
| UE | União Europeia |
| USAED | <i>Ultrasonic Assisted Enzymatic Digestion</i> (Digestão ultrassónica enzimática assistida) |
| USE | <i>Ultrasonic Solvent Extraction</i> (Extração ultrassónica com solvente) |
| UV | Ultravioleta |
| UV326 | 2-(3- <i>terc</i> -butil-2-hidroxi-5-metilfenil)-5-clorobenzotriazol |
| UV327 | 2-(2'-hidroxi-3',5'-di- <i>t</i> -butilfenil)-5-clorobenzotriazol |
| UV328 | 2-(2-hidroxi-3,5-diprenil-fenil) benzotriazol |
| UV329 | 2-(2'-hidroxi-5'-(2,4,4-trimetilpentilfenil))-benzotriazol |
| UVP | (2'-hidroxi-5'-metilfenil) benzotriazol |
| z | Carga do ião |

1 Introdução

1.1 Enquadramento e apresentação do projeto

Com o crescimento da indústria cosmética ao longo dos anos, e o consumo cada vez maior dos seus produtos, a concentração de substâncias sintéticas nos compartimentos ambientais tem aumentado consideravelmente. Nos últimos anos, alguns compostos incluídos nos produtos de higiene e cuidado pessoal têm suscitado uma preocupação crescente devido aos potenciais efeitos nocivos em organismos aquáticos e à sua possível toxicidade no ser humano (Daughton, 2001). É o caso dos filtros-UV e *musks* sintéticos que são suspeitos de serem disruptores endócrinos (Daughton & Ternes, 1999).

Os compostos designados por produtos de cuidado pessoal (PCPs) e incorporados nos produtos cosméticos e de higiene são considerados contaminantes de preocupação emergente, ou seja, químicos têm sido detetados no ambiente e que recentemente se descobriu que a sua toxicidade ou persistência são suscetíveis de alterar significativamente o metabolismo de um ser vivo (Sauvé & Desrosiers, 2014). Nos PCPs estão incluídos os almíscares (*musks*) sintéticos e os filtros-UV. Os almíscares sintéticos surgiram nos anos 50 e são fixadores de fragrâncias (considerados notas de base na perfumaria), podendo também ser utilizados como aditivos numa vasta gama de produtos de higiene e cuidado pessoal (por exemplo em loções, champôs, desodorizantes, géis de banho, cremes hidratantes, perfumes, protetores solares, etc.) e produtos de limpeza como detergentes, amaciadores e ambientadores (Boxall *et al.*, 2012). Já os filtros-UV são maioritariamente incorporados em cosméticos (como protetores solares, cremes hidratantes, maquilhagem facial e produtos para os lábios), mas também são incluídos em plásticos, adesivos, tintas e borrachas, para a proteção contra a degradação UV (Dobashi *et al.*, 2007).

A União Europeia estabeleceu concentrações máximas autorizadas para alguns destes compostos nos produtos cosméticos, como o *musk ketone* (0,042-1,4%), enquanto a utilização do *musk xylene* (Comissão Europeia, 2011) e dos *musks ambrette*, *tibetene* e *moskene* está proibida (Parlamento Europeu, 2009). Neste mesmo documento são impostas as concentrações mássicas máximas autorizadas de uso de cada filtro ultravioleta nos produtos cosméticos, como 4-MBC (4%), BP3 (5%, em ácido), EDP (8%) e ES (5%) (Parlamento Europeu, 2009).

Após estes produtos serem usados, grande parte tem como destino o sistema de saneamento local, atingindo as Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs), que não conseguindo remover estes compostos, os lançam para os compartimentos aquáticos próximos, podendo mesmo chegar à foz dos rios e às praias (Gavrilescu *et al.*, 2015). Uma outra via para que estes compostos se fixem nos compartimentos ambientais é através da proximidade dos seus utilizadores humanos, através de diversas atividades de lazer (desporto, caminhadas, trabalhos, etc.), que podem inclusive levar a que estes PCPs se depositem nas zonas próximas à costa.

Entre os vários compartimentos ambientais em que os *musks* e filtros-UV se apresentam, os mais destacados são o solo, a água e a biota (Caliman & Gavrilescu, 2009). A presença de *musks* e filtros-UV em biota já foi reportada através de estudos em peixes (Balmer *et al.*, 2005; Brausch & Rand, 2011; Chen *et al.*, 2015; Foltz *et al.*, 2014; Gago-Ferrero *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016; Heberer, 2002), moluscos (Brausch & Rand, 2011; Cunha *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016) e algas (Brausch & Rand, 2011; Cunha *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016). No entanto, a ocorrência destes compostos nas plantas é um tema recente e ainda pouco estudado. As espécies vegetais são bons marcadores do estado do ambiente que as rodeia, devido à sua imobilidade. Esta característica leva a que as plantas sejam ótimas amostradoras de substâncias voláteis e solúveis em água, que penetram nos tecidos vegetais através da deposição nas folhas ou da captação através das raízes, existindo uma acumulação dos compostos. Assim, a medição das concentrações dos compostos que se acumularam fornece uma visão geral da ocorrência e persistência ao longo do tempo no local aonde se encontrava a planta.

Como mencionado anteriormente, o destino final da maioria deste tipo de poluentes é o mar. Assim, as praias podem ser consideradas locais propensos à acumulação destes compostos, quer através da sua presença na água do mar, quer como locais de escolha frequente para a realização de atividades antropogénicas ao longo de todo o ano. As plantas que se enquadram nestes meios costeiros são, por isso, bons biomonitores de poluentes.

É neste contexto que é desenvolvido este estudo, visando testar a hipótese de que as espécies vegetais da orla costeira funcionem como bioamostradores de acumulação de filtros-UV e *musks* sintéticos. Assim, este trabalho tem como principal objetivo verificar qual a espécie mais propensa a tal função, determinando a concentração destes compostos em plantas dunares de diferentes pontos da zona litoral do Porto. Para tal utilizou-se a técnica de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) como método de extração e *clean-up* e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) como método instrumental de análise.

1.2 *Musks* sintéticos

Os *musks* sintéticos são considerados PCPs com um uso global, estando presentes em vários produtos de higiene pessoal e produtos de limpeza como aditivos de fragrâncias e elementos fixadores (Lu *et al.*, 2011). Devido às suas propriedades físico-químicas, são considerados bioacumuláveis, lipofílicos e apenas parcialmente biodegradáveis (Paasivirta *et al.*, 2002). Para além de serem pseudo-persistentes, devido à sua contínua emissão, os *musks* são também semivoláteis, justificando-se assim a sua presença em áreas remotas, pois o seu transporte atmosférico é de longo alcance, levando a que haja uma grande dispersão no ambiente (Arbulu *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2011). Relativamente à sua toxicidade, estudos já efetuados demonstraram que alguns *musks* são tóxicos para os embriões e larvas de peixes (Carlsson & Norrgren, 2004).

A caracterização físico-química destes compostos é efetuada por várias propriedades como o seu ponto de ebulição, solubilidade em água, coeficiente de partilha octanol-água e fator de bioconcentração. As principais propriedades físico-químicas dos *musks* podem ser divididas em várias classes como se apresenta a seguir. Um composto com um ponto de ebulição de 400 °C ou superior não é considerado volátil. São considerados altamente solúveis em água para valores de solubilidade iguais ou acima de $1,0 \times 10^4$ mg/L, solúveis para valores entre $1,0 \times 10^4$ mg/L e $1,0 \times 10^3$ mg/L, moderadamente solúveis para valores entre $1,0 \times 10^3$ mg/L e $1,0 \times 10^2$ mg/L, pouco solúveis entre $1,0 \times 10^2$ mg/L e $1,0 \times 10^{-1}$ mg/L e desprezivelmente solúveis abaixo de $1,0 \times 10^{-1}$ mg/L (EPA, 2012). Os compostos com valores do logaritmo do coeficiente de partilha octanol-água ($\log K_{ow}$) inferiores a 1 são considerados hidrofílicos, acima de 4 são considerados hidrofóbicos, maiores que 8 são de difícil biodisponibilidade e superiores a 10 a sua biodisponibilidade é nula. Substâncias químicas com $\log K_{ow}$ maior que 4 tendem a não ser bem absorvidas pelas membranas biológicas e para valores de 5-6 bioconcentram na membrana plasmática. O fator de bioconcentração (BCF) transmite o potencial que um químico tem em se bioconcentrar nos lípidos de um organismo. O logaritmo de BCF maior ou igual que 3,7 indica grande potencial de bioconcentração, de 3 a 3,7 o composto tem um potencial moderado para se bioconcentrar e para valores menores que 3 o potencial de bioconcentração é baixo (EPA, 2012).

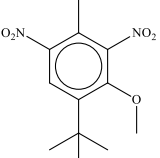
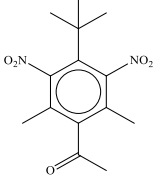
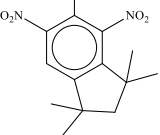
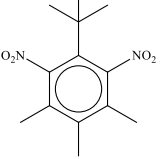
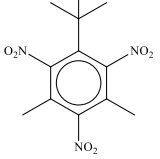
De acordo com a sua estrutura molecular, os *musks* sintéticos podem ser divididos em quatro grupos: *nitromusks*, *musks* policíclicos, *musks* macrocíclicos e *musks* alicíclicos.

1.2.1 *Nitromusks*

Os *nitromusks* são usados frequentemente como ingredientes de fragrância na formulação de perfumes e produtos sanitários. Estes vieram substituir os *musks* naturais, pois para além de serem muito caros, a sua extração colocava em risco espécies selvagens (Foltz *et al.*, 2014; Regueiro *et al.*, 2007). Houve um decréscimo na sua produção em meados dos anos 80 como resultado de situações de reações alérgicas ao *musk ambrette* (Sommer, 2004) que levaram à criação de legislação para restringir e banir o uso de *nitromusks*. De 1992 a 2000 a produção de *musk xylene* e

musk ketone variou entre 35 e 174 toneladas por ano, enquanto o *musk moskene* e *musk tibetene* eram produzidos entre 0,8 e 5 toneladas por ano até serem proibidos (OSPAR, 2004). Como já referido, na União Europeia o Regulamento (CE) N.º 1223/2009 e o Regulamento da Comissão (UE) N.º 143/2011 vieram proibir o uso do *musk ambrette*, *moskene*, *tibetene* e *xylene* nos produtos cosméticos e restringir o uso do *musk ketone* (0,042-1,4%). No entanto, a detecção destes *nitromusks* no ambiente e nos seres humanos continua a ser recorrente. Na Tabela 1.1 apresentam-se as propriedades físico-químicas dos *nitromusks*.

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas dos principais *nitromusks*

| Composto Fórmula molecular CAS# | Estrutura molecular | M (g/mol) | PE (°C) ^a | Log K _{OW} ^b | s (mg/L) ^b | Log BCF ^b |
|--|---|-----------|----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Musk ambrette (MA) C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₅ 83-66-9 |  | 268,3 | 369 | 4,2 | 2,11 | 2,416 |
| Musk ketone (MK) C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅ 81-14-1 |  | 294,3 | 369 | 4,3 | 1,15 | 1,919 |
| Musk moskene (MM) C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄ 116-66-5 |  | 278,3 | 351 | 5,4 | 0,16 | 3,224 |
| Musk tibetene (MT) C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄ 145-39-1 |  | 266,3 | 391 | 5,2 | 0,29 | 3,085 |
| Musk xylene (MX) C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₆ 81-15-2 |  | 297,3 | 392 | 4,5 | 0,82 | 2,603 |

^aRoyal Society of Chemistry, 2015 - predicted using the ACD/Labs' ACD/PhysChem Suite; ^bUS Environmental Protection Agency's EPI Suite™, 2012; M - massa molar; PE - ponto de ebulição a 760 mmHg; K_{OW} - coeficiente de partilha octanol-água; s - solubilidade em água a 25 °C; BCF - fator de bioconcentração

Estudos recentes têm indicado que muitos dos *nitromusks* são pseudo-persistentes no ambiente e têm potencial para se bioacumularem (Peck & Hornbuckle, 2006). Por exemplo, já foram detetados no ar (0,001-4,790 ng/m³) (Kallenborn *et al.*, 1999), águas residuais (0,3-152 ng/L) (Osemwengie & Steinberg, 2001) e peixes fluviais (21-2100 ng/g) (Ramirez *et al.*, 2009). Mais importante é o facto de estudos terem identificado que os *nitromusks* não são só acumulados como são subsequentemente metabolizados nos tecidos animais, apresentando um tempo de semivida de 2 a 9 dias nos peixes (Mottaleb *et al.*, 2012). A dose letal mediana (DL₅₀) para duas espécies de

crustáceos foi verificada para níveis superiores a 1 mg/L e 1,32 mg/L para o *musk ketone* (Breitholtz *et al.*, 2003; Wollenberger *et al.*, 2003).

Analisando os dados da Tabela 1.1 pode-se verificar que todos os *musks* apresentam um valor de coeficiente de partilha octanol-água superior a 4, permitindo concluir que apresentam elevada afinidade por fases orgânicas e lipofílicas, bem como potencial de adsorção em matérias particuladas em suspensão no ar e água. O facto de serem hidrofóbicos também é verificado por serem pouco solúveis, sendo o MA e MK os mais solúveis. A maioria destes *nitromusks* tem baixo potencial para se bioacumularem, embora o MM e MT apresentem um potencial moderado.

1.2.2 *Musks* policíclicos

Para substituir os *nitromusks*, devido aos seus efeitos nocivos na saúde humana, surgiram os *musks* policíclicos, passando a ser os *musks* sintéticos mais produzidos e os que dominam o mercado global atual (Bester & Theobald, 1998). Desde o seu desenvolvimento nos anos 50, que os *musks* policíclicos têm sido usados como fixadores de fragrâncias em cosméticos e detergentes. Atualmente têm ganho um interesse crescente devido ao seu grande consumo (representam 85% do total de *musks* sintéticos produzidos) (Heberer, 2002). O facto de apresentarem propriedades desencadeadoras de dermatites e problemas endócrinos e serem detetados em concentrações potencialmente alarmantes no ambiente também levou a que o seu estudo fosse aprofundado (Salvito *et al.*, 2004).

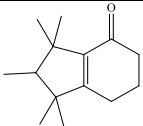
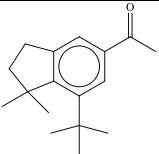
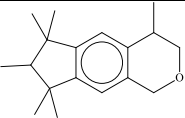
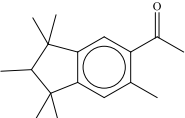
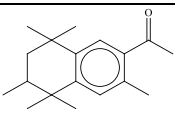
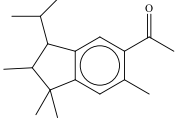
Devido às suas propriedades lipofílicas, os *musks* policíclicos têm tendência a se bioacumularem e bioampliar na cadeia alimentar, tendo impactos no sistema ecológico e na saúde humana (Rimkus, 1999). Até à presente data, os *musks* policíclicos *tonalide* (AHTN) e *galaxolide* (HHCB) têm tido a sua toxicidade bem avaliada, enquanto para outros compostos deste grupo não existem ainda conclusões claras (Liu *et al.*, 2015). Tal facto é justificado pelos *musks tonalide* e *galaxolide* serem os policíclicos mais produzidos em quantidade, contribuindo em conjunto para 95% do mercado da UE destes produtos (HERA, 2004). Outros *musks* policíclicos como o *celestolide* (ADBI), *phantolide* (AHMI) e *traseolide* (ATII) representam os restantes 5% do mercado. O AHTN e HHCB são considerados potencialmente persistentes (OSPAR, 2004) e apresentam DL₅₀ em crustáceos marinhos entre 0,47 e 1,90 mg/L (Breitholtz *et al.*, 2003; Wollenberger *et al.*, 2003).

O elevado uso de *musks* policíclicos nos produtos cosméticos tem resultado na sua ocorrência em diversos compartimentos ambientais, como águas residuais (0,015-0,32 µg/L) (Clara *et al.*, 2011), águas superficiais (56-794 ng/L) e sedimentos (0,33-72 ng/g) (Chase *et al.*, 2012), ar (0,032-0,80 ng/m³) (Peck & Hornbuckle, 2006), bem como em amostras biológicas como em leite, sangue e tecido adiposo humanos (114-1500 ng/L) (Hutter *et al.*, 2005). A legislação atualmente em vigor na União Europeia não estabelece qualquer limitação quanto ao uso desta classe de compostos. A Tabela 1.2 apresenta as propriedades dos principais compostos deste grupo de *musks*.

Analisando os dados da Tabela 1.2 confirma-se, através dos valores dos coeficientes de partilha octanol-água superiores a 4 e maioritariamente entre 5 e 6, que todos os *musks* policíclicos

apresentados são hidrofóbicos e a grande maioria tende a se fixar na bicamada lipídica dos organismos. Destes, o DPMI é o menos hidrofóbico e, por isso, o que apresenta maior solubilidade na água (mesmo assim é pouco solúvel). O HHCB e ATII são os compostos com mais apetência para se bioacumularem.

Tabela 1.2 - Propriedades físico-químicas dos principais *musks* policíclicos

| Composto Fórmula molecular CAS# | Estrutura molecular | M (g/mol) | PE (°C) ^a | Log K _{OW} ^b | s (mg/L) ^b | Log BCF ^b |
|--|---|-----------|----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Musk cashmeran (DPMI) C ₁₄ H ₂₂ O 33704-61-9 |  | 206,3 | 286 | 4,5 | 5,94 | 2,630 |
| Musk celestolide (ADBI) C ₁₇ H ₂₄ O 13171-00-1 |  | 244,4 | 309 | 5,9 | 0,22 | 2,993 |
| Musk galaxolide (HHCB) C ₁₈ H ₂₆ O 1222-05-5 |  | 258,4 | 326 | 6,3 | 0,19 | 3,560 |
| Musk phantolide (AHMI) C ₁₇ H ₂₄ O 15323-35-0 |  | 244,4 | 337 | 5,9 | 0,25 | 2,944 |
| Musk tonalide (AHTN) C ₁₈ H ₂₆ O 1506-02-1 |  | 258,4 | 357 | 6,4 | 0,29 | 2,843 |
| Musk traseolide (ATII) C ₁₈ H ₂₆ O 68140-48-7 |  | 258,4 | 350 | 6,3 | 0,09 | 3,245 |

^aRoyal Society of Chemistry, 2015 - predicted using the ACD/Labs' ACD/PhysChem Suite; ^bUS Environmental Protection Agency's EPI Suite™, 2012; M - massa molar; PE - ponto de ebulição a 760 mmHg; K_{OW} - coeficiente de partilha octanol-água; s - solubilidade em água a 25 °C; BCF - fator de bioconcentração

1.2.3 *Musks* macrocíclicos

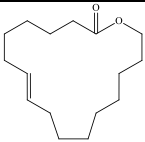
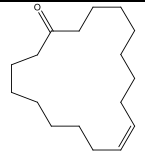
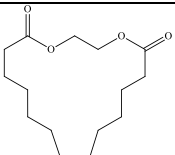
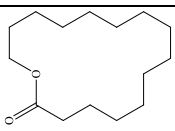
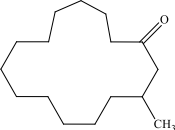
Os *musks* macrocíclicos são quimicamente semelhantes aos *musks* naturais com grandes anéis de cetonas e lactonas, compreendendo entre 10 a 15 átomos de carbono (Abramsson-Zetterberg & Slanina, 2002). Não foram tão usados ao longo dos anos como os policíclicos, muito devido ao seu alto custo de produção (Sommer, 2004). No entanto, os avanços nos métodos de síntese têm vindo a permitir um menor custo de produção e, por isso, maior viabilidade para se produzirem *musks* macrocíclicos (Bester, 2009). Comparativamente com os *musks* policíclicos, os macrocíclicos apresentam a vantagem de apresentarem um cheiro mais intenso e necessidade de menor massa para atingir um mesmo resultado. Para além disso são mais facilmente degradáveis no ambiente (Vallecillos *et al.*, 2013).

Pouco se conhece acerca da exposição humana a *musks* macrocíclicos provenientes de produtos comerciais e a informação da ocorrência e da concentração nos produtos para casa é muito

fragmentada e limitada. No entanto, estudos já realizados reportam que o *musk ethylene brassylate* (EB) e *exaltolide* (EXA) são os mais comuns nos produtos comercializados (Sommer & Juhl, 2004). Uma revisão sobre o *musk ethylene brassylate* (EB) demonstra que este composto causa alergias a 29 em 50 pessoas e apresenta um DL₅₀ maior que 5 g/kg para o rato e coelho (McGinty *et al.*, 2011).

A ocorrência de *musks* macrocíclicos nos compartimentos ambientais tem sido testemunhada nas lamas (10-9000 ng/g de matéria seca e 0,09-2,0 ng/g) (Matamoros *et al.*, 2012; Vallecillos *et al.*, 2013) e no ar interior (220-1300 ng/g) (Nakata *et al.*, 2015), estando o seu estudo a decorrer com maior frequência nos últimos anos. Até à data não existe legislação na UE que restrinja o uso e a comercialização de produtos com estes compostos. A Tabela 1.3 contém as propriedades e estruturas moleculares dos *musks* macrocíclicos.

Tabela 1.3 - Propriedades físico-químicas dos *musks* macrocíclicos

| Composto Fórmula molecular CAS# | Estrutura molecular | M (g/mol) | PE (°C) ^a | Log K _{ow} ^b | s (mg/L) ^b | Log BCF ^b |
|--|---|-----------|----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Musk ambrettolide C ₁₆ H ₂₈ O ₂ 123-69-3 |  | 252,4 | 399 | 5,4 | 0,59 | 3,212 |
| Musk civetone C ₁₇ H ₃₀ O 542-46-1 |  | 250,4 | 371 | 6,3 | 0,10 | 3,832 |
| Musk ethylene brassylate (EB) C ₁₅ H ₂₆ O ₄ 105-95-3 |  | 270,4 | 476 | 4,7 | 1,72 | 2,776 |
| Musk exaltolide (EXA) C ₁₆ H ₂₈ O ₂ 106-02-5 |  | 240,4 | 345 | 6,2 | 0,15 | 3,727 |
| Musk muscone C ₁₆ H ₃₀ O 541-91-3 |  | 238,4 | 330 | 6,0 | 0,22 | 3,602 |

^aRoyal Society of Chemistry, 2015 - predicted using the ACD/Labs' ACD/PhysChem Suite; ^bUS Environmental Protection Agency's EPI Suite™, 2012; M - massa molar; PE - ponto de ebulição a 760 mmHg; K_{ow} - coeficiente de partilha octanol-água; s - solubilidade em água a 25 °C; BCF - fator de bioconcentração

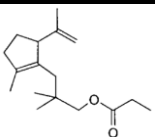
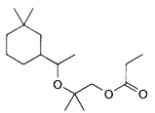
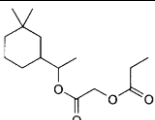
Desta tabela conclui-se que os *musks* macrocíclicos apresentam um log K_{ow} superior a 4, sendo considerados lipofílicos. O composto menos lipofílico é o EB que consequentemente apresenta a maior solubilidade em água. O EXA e o *musk civetone* têm um grande potencial para se bioacumularem, ao contrário do EB que tem pouca capacidade para se bioconcentrar nos organismos.

1.2.4 *Musks* alicíclicos

Os *musks* alicíclicos surgiram em 1975 com o objetivo de serem biodegradáveis e terem menores custos de produção, apresentando-se como a quarta geração de *musks* sintéticos. O primeiro alicíclico criado foi o *cyclomusk* que possui um odor parecido com morango, o segundo foi o *helvetolide* com um aroma a pera e em 2000 foi sintetizado o *romandolide* (Eh, 2004) que é biodegradável (Seyfried *et al.*, 2014).

Os estudos sobre estas substâncias são ainda escassos, não existindo dados indicativos de que os *musks* alicíclicos surjam nas estações de tratamento de águas residuais ou em qualquer compartimento ambiental, tanto quanto é do conhecimento do autor. O seu aparecimento no ambiente estará dependente da sua biodegradabilidade e do aumento da produção e incorporação destes compostos nos cosméticos e detergentes. A Tabela 1.4 resume as propriedades dos compostos.

Tabela 1.4 - Propriedades físico-químicas dos *musks* alicíclicos

| Composto Fórmula molecular CAS# | Estrutura molecular | M (g/mol) | PE (°C) ^a | Log K _{ow} ^b | s (mg/L) ^b | Log BCF ^b |
|--|---|-----------|----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Musk cyclomusk C ₁₇ H ₂₈ O ₂ 84012-64-6 |  | 264,4 | 348 | 6,5 | 0,05 | 4,133 |
| Musk helvetolide C ₁₇ H ₃₂ O ₃ 141773-73-1 |  | 284,4 | 346 | 5,5 | 0,30 | 3,303 |
| Musk romandolide C ₁₅ H ₂₆ O ₄ 236391-76-7 |  | 270,4 | 335 | 4,5 | 2,86 | 2,606 |

^aRoyal Society of Chemistry, 2015 - predicted using the ACD/Labs' ACD/PhysChem Suite; ^bUS Environmental Protection Agency's EPI Suite™, 2012; M - massa molar; PE - ponto de ebulição a 760 mmHg; K_{ow} - coeficiente de partilha octanol-água; s - solubilidade em água a 25 °C; BCF - fator de bioconcentração

Comparativamente com os restantes grupos de *musks*, os alicíclicos têm as mesmas características de lipofibicidade e pontos de ebulição elevados. No geral, este grupo de *musks* é considerado hidrofóbico. O *cyclomusk* tem grande potencial para se bioconcentrar, *helvetolide* potencial moderado e *romandolide* baixo potencial para se bioacumular.

1.3 Filtros-UV

Com o aumento da exposição a raios ultravioleta por parte do ser humano, devido aos seus hábitos excessivos de permanência ao sol, vários problemas de pele têm surgido como queimaduras, *photoaging* e até cancro (Petrazzuoli, 2000). Devido a esta problemática o consumo de protetores solares, tem vindo a crescer, levando ao aparecimento no ambiente de alguns dos compostos que

os constituem. Os protetores solares têm como ingrediente ativo os filtros-UV, que podem ser usualmente divididos em duas classes: orgânicos e inorgânicos (Serpone *et al.*, 2007).

Os filtros-UV inorgânicos (dióxido de titânio e óxido de zinco) refletem e dispersam a radiação ultravioleta e visível através de uma barreira opaca formada por partículas metálicas inertes, apresentando características de fotoestabilidade, não reagindo com os agentes orgânicos (Lautenschlager *et al.*, 2007). Protetores solares contendo apenas agentes inorgânicos são menos eficazes e contêm menor aceitabilidade cosmética e menor benevolência do consumidor, justificada pelo facto de tornarem os protetores solares opacos e espessos (Nohynek & Schaefer, 2001).

Os filtros-UV orgânicos estão presentes em vários produtos de cuidado pessoal, como protetores solares, produtos cosméticos, géis de banho e lacas para o cabelo, absorvendo as gamas de radiação UV perigosas para o Homem (UVA: 320-400 nm; UVB: 280-320 nm) (Giokas *et al.*, 2007). Os eletrões destes agentes orgânicos são excitados pela radiação ultravioleta. Com o tempo, os eletrões voltam a ficar estáveis, dispersando a energia sob a forma de calor (Wang *et al.*, 2010). A sua toxicidade deve-se às características de fotoinstabilidade, que origina alergia na pele em que está em contato, e leva a suspeitas de fotocarcinogenicidade e *photoaging* (Gilbert *et al.*, 2013), levando a que estes sejam utilizados nos protetores solares em misturas com filtros-UV inorgânicos. Esta classe de filtros-UV é a mais frequentemente usada e em concentrações mais elevadas (Wolf *et al.*, 2001).

No Anexo VI do Regulamento (CE) N.º 1223/2009, são apresentados 26 filtros-UV orgânicos e 1 inorgânico cuja incorporação em produtos cosméticos é permitida na UE, desde que as suas concentrações não ultrapassem os limites estabelecidos neste mesmo regulamento. No entanto, se o Regulamento da UE relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CLP) fosse aplicado aos filtros-UV, 12 dos 26 compostos referidos anteriormente seriam classificados como perigosos para o meio ambiente, e 4 destes 12 seriam classificados com a categoria mais elevada de toxicidade (Sobek *et al.*, 2013). Como não há estudos que comprovem a sua toxicidade, apenas o Regulamento (CE) N.º 1223/2009 é aplicado, banindo vários filtros-UV orgânicos dos produtos cosméticos, como se apresenta no Anexo 1.

Os filtros-UV podem entrar no sistema aquático indiretamente pelas descargas de efluentes de ETARs e diretamente através da prática de atividades desportivas e de lazer (Langford *et al.*, 2015). A sua ocorrência parece estar dependente da sazonalidade e das condições meteorológicas, sendo usualmente detetados no meio ambiente em maiores concentrações no verão do que no inverno (Tsui *et al.*, 2014). Estes compostos estão sob atenção da comunidade científica devido às suas propriedades potencialmente tóxicas e efeitos adversos, como efeitos estrogénicos na biota e no ser humano entre outras disfunções hormonais (Schlumpf *et al.*, 2004; Weisbrod *et al.*, 2007). No ambiente, os filtros-UV podem ser degradados pela luz solar, mas quando em conjunto com outros compostos presentes nos protetores solares, apenas se degradam em certas condições ambientais e na presença de matéria orgânica (Sakkas *et al.*, 2003).

Os principais filtros-UV orgânicos podem ser agrupados em 11 famílias diferentes: derivados de benzofenona, ácido *p*-aminobenzóico, cânfora, benzotriazol, salicilato, triazina, benzimidazol, cinamato, benzalmalonato, crileno e dibenzoilmetano. Os filtros orgânicos podem ainda ser divididos em três grupos segundo as gamas de radiação UV que absorvem: UVA, UVB ou ambas (Shaath, 2010).

1.3.1 Filtros UVA orgânicos

Segundo a legislação europeia, os filtros orgânicos que apenas absorvem radiação na gama UVA e cuja utilização é autorizada nos produtos cosméticos são o 2-(4'-dietilamino-2'-hidroxibenzoil)-benzoato de hexilo (DHBB) (máximo de 10% em protetores solares), o ácido sulfônico de dicânfora de tereftalideno (TDSA) (concentração máxima de 10% em ácido), o 4-*terc*-butil 4'-metoxidibenzoilmetano (BMDM) (concentração máxima de 5%) e o disódio fenil dibenzimidazol tetrasulfonato (DPDT) (concentração máxima de 10% em ácido) (Parlamento Europeu, 2009). O mais usado nos produtos cosméticos é o DHBB (Mikkelsen *et al.*, 2015).

A presença destas substâncias no meio ambiente tem sido reportada em diversos estudos, nomeadamente em sedimentos (14,7-1770,3 ng/L) (Rodríguez *et al.*, 2015) e na água doce e salgada em valores entre os 62 e 303 ng/L (Bratkovics & Sapozhnikova, 2011). Alguns estudos apresentam resultados positivos no que diz respeito à atividade estrogénica de alguns filtros UVA (Morohoshi *et al.*, 2005). O DHBB, TDSA e DPDT não são facilmente degradáveis, podendo ser considerados como potencialmente persistentes. A dose letal mediana (DL₅₀) para estes compostos nos peixes, invertebrados e algas varia entre 73 mg/L e valores acima de 100 mg/L (ECHA, 2016).

O Anexo 1 apresenta as principais propriedades destes filtros-UV, onde se destacam diferenças notáveis entre cada composto, devido a pertencerem a diferentes famílias químicas. O DHBB tem um log K_{ow} acima de 4, apresentando características hidrofóbicas, já o DPDT é hidrofílico. Apenas o DHBB apresenta um fator de bioconcentração entre 3 e 3,7 sendo por isso o único com potencial moderado para se bioconcentrar.

1.3.2 Filtros UVB orgânicos

Dos filtros-UV orgânicos que absorvem apenas radiação ultravioleta na gama UVB, os autorizados pela UE nos produtos cosméticos são os derivados do ácido *p*-aminobenzóico benzoato de 2-etil-hexil 4-dimetilamino (EDP) (8%), etil-hexil triazona (EHT) (5%) e etoxilado etil-4-aminobenzoato (PEG-25 PABA) (10%), os derivados de cânfora 3-(4'-metilbenzilideno) (4-MBC) (4%), 3-benzilideno (3BC) (2%), ácido sulfônico de cânfora de benzilideno (BCSA) (6% em ácido) e metassulfato de cânfora de 3-(4'-benzilideno aquilamónio) (CBM) (6%), os derivados de salicilato, salicilato de 2-etil-hexil (ES) (5%) e salicilato de 3,3,5-trimetilciclo-hexilo (HMS) (10%), o dietil-hexil butamido triazina (DBT) (10%), os derivados de cinamato 4-metoxicinamato de 2-etil-hexilo (EMC) (10%) e 4-metoxicinamato de isoamilo (IMC) (10%), o ácido sulfônico de 2-fenil-5-benzimidazol (PBSA) (8% em ácido) e o 2-ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etil-hexilo (octocrileno) (OC) (10% em ácido) (Parlamento Europeu, 2009).

O ácido *p*-aminobenzóico é um filtro-UV patenteado em 1943, e que nos anos 80 lhe foi atribuído o problema de danificação do ADN em células de mamíferos (Osgood *et al.*, 1982). Tem sido usado tanto em protetores solares como em produtos farmacêuticos, e a sua contínua emissão para o ambiente tem causado também o aumento de casos de fotossensibilidade (Zhou *et al.*, 2013). É um dos filtros-UV de uso comum e que causa fotoalergia (Sambandan & Ratner, 2011). Alguns estudos já realizados demonstraram que os derivados do ácido *p*-aminobenzóico podem ser encontrados em matrizes aquosas (95-182 ng/L) (Tsui *et al.*, 2014) e sedimentos (6,0-9,0 ng/g de matéria seca) (Amine *et al.*, 2012). O EHT não é facilmente biodegradável. A DL₅₀ do EHT não é tóxica para os peixes, algas e invertebrados (ECHA, 2016).

Os derivados de cânfora são uma classe dos filtros-UV com atividade estrogénica, presente nos protetores solares (Schlumpf *et al.*, 2004). Os compostos mais estudados são o 4-MBC e o 3BC, que são também os derivados de cânfora mais comuns nos produtos, sendo que o 4-MBC serve eficientemente como filtro da radiação UVB a 300 nm (Ferreira *et al.*, 2014). Estes compostos têm sido detetados em compartimentos ambientais como os sedimentos (7,90-17,2 ng/g de matéria seca) (Barón *et al.*, 2013) e biota (0,2-41,5 ng/g de matéria seca) (Peng *et al.*, 2015). O estudo destes compostos ainda é recente e apenas se tem certezas de que o 4-MBC atinge os recursos ambientais. O nível mínimo em que se observam efeitos adversos no ambiente (LOAEL) são 7 mg/kg para o 4-MBC e 0,24 mg/kg para o 3BC (Schlumpf *et al.*, 2008).

Os salicilatos são dos agentes mais antigos usados em protetores solares. São insolúveis em água e apresentam uma baixa penetração na pele (Palm & O'Donoghue, 2007). A sua ocorrência no ambiente tem sido reportada, nomeadamente em matrizes aquosas (6-450 ng/L) (Negreira *et al.*, 2010). O HMS é o salicilato mais comum nos cosméticos (Mikkelsen *et al.*, 2015). O ES não denota ser persistente no meio ambiente, enquanto o HMS apresenta um tempo de meia-vida para a hidrólise de aproximadamente 10 dias, sendo considerado biodegradável (ECHA, 2016). Os estudos de toxicidade aguda dos salicilatos por via cutânea nos coelhos e por via oral nos ratos apresentaram valores de DL₅₀ superiores a 5000 mg/kg (Belsito *et al.*, 2012).

Os filtros-UV, para além dos já mencionados, já foram detetados maioritariamente em matrizes aquosas (3-7 ng/L) (Balmer *et al.*, 2005) e sedimentos (12-304 ng/g) (Amine *et al.*, 2012). Destes, o cinamato EMC e o crileno OC são os compostos que são mais usados nos produtos consumíveis (Mikkelsen *et al.*, 2015). O OC, DBT e EMC têm um tempo de meia-vida na água superior a 1 ano, enquanto o IMC é biodegradável (ECHA, 2016). Os efeitos ecotoxicológicos do OC foram estudados em diversos invertebrados marinhos, não se comprovando serem prejudiciais para estes seres vivos (Kaiser *et al.*, 2012).

Analisando a Tabela 1.5 e o Anexo 1, pode-se verificar que os derivados de salicilato são a família destes compostos que apresenta uma maior uniformidade de características físico-químicas. Quanto à solubilidade em água, há substâncias desde muito insolúveis na água, como o EHT, até altamente solúveis como o PBSA. O EHT é também o que se fixa mais nos lípidos, ao invés do CBM que é muito hidrofílico. Os fatores de bioconcentração variam muito entre cada filtro UVB sendo o

mais propenso a se bioacumular, o crileno OC. A Tabela 1.5 e Anexo 1 contêm as propriedades mais significativas dos filtros UVB.

Tabela 1.5 - Propriedades físico-químicas de alguns dos filtros UVB orgânicos mais comuns no mercado

| Composto | | M (g/mol) | PE (°C) ^a | Log K _{ow} ^b | s (mg/L) ^b | Log BCF ^b |
|------------------------------------|---|-----------|----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Fórmula molecular | CAS# | | | | | |
| Estrutura molecular | | | | | | |
| Derivados do ácido p-aminobenzoico | Benzoato de 2-etil-hexil 4-dimetilamino (EDP) | | | | | |
| | C ₁₇ H ₂₇ NO ₂ 21245-02-3 | 277,4 | 383 | 5,8 | 0,20 | 3,471 |
| Derivados de cânfora | Cânfora de 3-(4'-metilbenzilideno) (4-MBC) | | | | | |
| | C ₁₈ H ₂₂ O 36861-47-9 | 254,4 | 372 | 5,9 | 0,20 | 3,573 |
| Derivados de cinamato | 4-Metoxicinamato de 2-etil-hexilo (EMC) | | | | | |
| | C ₁₈ H ₂₆ O ₃ 5466-77-3 | 290,4 | 405 | 5,8 | 0,15 | 3,495 |
| Derivados de crileno | 2-Ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etil-hexilo (octocrileno) (OC) | | | | | |
| | C ₂₄ H ₂₇ NO ₂ 6197-30-4 | 361,5 | 479 | 6,9 | 4,00x10 ⁻³ | 4,207 |

^aRoyal Society of Chemistry, 2015 - predicted using the ACD/Labs' ACD/PhysChem Suite; ^bUS Environmental Protection Agency's EPI Suite™, 2012; M - massa molar; PE - ponto de ebulição a 760 mmHg; K_{ow} - coeficiente de partilha octanol-água; s - solubilidade em água a 25 °C; BCF - fator de bioconcentração

1.3.3 Filtros UVA/UVB orgânicos

Os filtros orgânicos que absorvem ambas as gamas de radiação UVA e UVB e cuja utilização em cosmética está autorizada na UE são os derivados de benzofenona 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP3) (10%), 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-ácido sulfônico (BP4) (5% em ácido) e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfonato de sódio (BP5) (5% em ácido), os derivados de benzotriazol drometrizol trisiloxano (DTS) (15%) e metileno bis-benzotriazolil tetrametil butilfenol (MBBT) (10%) e o bis-etil-hexiloxifenol metoxifenol triazina (BEMT) (10%) (Parlamento Europeu, 2009). O BP3 é o composto mais comumente usado nos cosméticos (Mikkelsen *et al.*, 2015).

As benzofenonas constituem um dos grupos mais usados de filtros-UV apesar de estar comprovado que as benzofenonas 1, 2 e 3 conduzem a desregulações hormonais (Heneweer *et al.*, 2005). São muito usados para a proteção da pele e cabelo (Chisvert *et al.*, 2012) e já foram detetados em matrizes ambientais como a água (3,2-36,6 ng/L) (Jurado *et al.*, 2014), sedimentos (0,133-4,66 ng/g de matéria seca) (Zhang *et al.*, 2011) e ar interior (1,21-36400 ng/g) (Wang *et al.*, 2013). A maioria dos derivados de benzofenona são moderadamente solúveis (Ramos *et al.*, 2015), sendo a família de filtros-UV que mais apetência tem para aparecer no meio aquático de forma

persistente, com um grande potencial para se bioacumularem ao longo da cadeia alimentar (Gago-Ferrero *et al.*, 2013). A ocorrência, a degradação e, em especial os potenciais efeitos tóxicos para os seres humanos têm atraído atenções para este grupo de filtros-UV (Hofkamp *et al.*, 2008). O tempo de semivida para a hidrólise do BP3 é de 41,9 dias a pH 7 e 25 °C (ECHA, 2016). A DL₅₀ nos crustáceos para os compostos BP3 e BP4 já foi calculada como sendo na ordem dos 1,9 mg/L (Fent *et al.*, 2010).

Os derivados de benzotriazol têm sido usados tanto em protetores solares como em materiais de construção em vários países, sendo classificados como potencialmente tóxicos, persistentes e bioacumuláveis no ambiente (Kim *et al.*, 2011). Um dos tipos mais comuns no mercado são os benzotriazóis estabilizadores de filtros-UV, usados também como inibidores de corrosão, em fluidos anticongelantes, em plásticos, nas lentes de contato e materiais de restauração dentária, para além de estarem presentes nos produtos de higiene pessoal (Montesdeoca-Esponda *et al.*, 2013). Os derivados de benzotriazol foram detetados em águas (86-105 ng/L) (Carpinteiro *et al.*, 2010), nos sedimentos (0,3-720 ng/g de matéria seca) e na biota (0,06-80 ng/g de matéria seca) (Nakata *et al.*, 2009). O DTS não é facilmente biodegradável, apresentando-se como muito persistente no ambiente (ECHA, 2016).

Por comparação das propriedades físico-químicas dos principais filtros-UV que absorvem tanto a radiação UVA como UVB (Anexo 1), verifica-se que os derivados de benzofenona apresentam compostos com hidrofobicidades diferentes, sendo na sua maioria compostos semivoláteis. Os benzotriazóis permitidos pela UE, são hidrofóbicos tal como a triazina BEMT. O BEMT apresenta um tempo de meia-vida no solo superior a 1000 dias e DL₅₀ entre 0,017 e 0,81 mg/L para os peixes, algas e invertebrados (ECHA, 2016). O composto com mais apetência para entrar nos tecidos biológicos é o MBBT por apresentar um log K_{OW} superior a 6. O filtro UVA e UVB com maior potencial para se bioacumular, permitido na UE, é o BEMT.

1.4 Espécies vegetais da orla costeira

Os compostos anteriormente referidos e que são incorporados nos produtos cosméticos, têm como destino final o meio ambiente. Uma das matrizes onde podem ser encontrados é nas plantas, que por processos de absorção, difusão e trocas gasosas os incorporam na sua estrutura. A bioacumulação dos *musks* e filtros-UV é maior quando existe uma maior propensão para a existência destes, como é o caso dos ambientes costeiros, onde a frequência de atividades de lazer e desportivas é mais elevada do que noutros ambientes naturais. As espécies vegetais situadas na orla costeira são expostas a estes compostos pela sua presença no ar, água e solo circundantes.

As espécies vegetais da orla costeira consistem maioritariamente em plantas terrestres presentes nas dunas das praias e algas presentes nos habitats marinhos. Neste estudo optou-se por estudar e recolher apenas plantas terrestres. Todas estas plantas espermatófitas têm uma estrutura básica idêntica, consistindo em raízes, caule e folhas, com sistemas internos condutivos para a água (débito transpiratório dentro do xilema - tecido de transporte de água e de sais minerais da raiz

para as partes aéreas) e sistemas de assimilação (no floema - tecido complexo de transporte de soluções orgânicas das folhas para os órgãos) (Chase *et al.*, 1993; Dinis, 2007). Neste sistema duplo de transporte, dá-se o movimento de água e solutos, orgânicos e inorgânicos, que se denomina por translocação. O movimento de solutos e de água para as plantas é feito através da osmose e da difusão, segundo os gradientes de concentração (Schimel, 1995). A água e as substâncias dissolvidas são transportadas em sentido ascendente, sendo que os produtos assimilados nas folhas são transportados para as zonas em crescimento, de armazenamento e frutos. Os contaminantes da atmosfera podem também ser depositados nas folhas (Beier & Gundersen, 1989). Os movimentos de substâncias que ocorrem entre o solo, planta e atmosfera estão descritos na Figura 1.1, tal como a estrutura genérica de uma planta espermatófito.

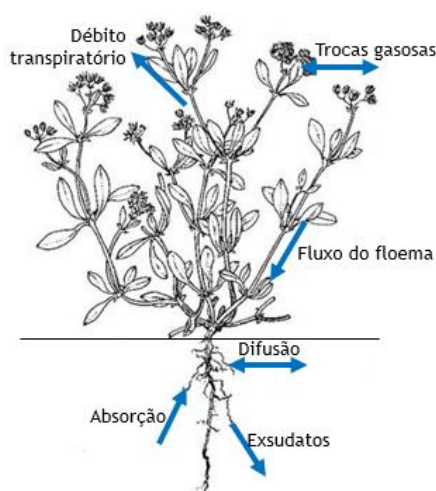


Figura 1.1 - Estrutura de uma planta espermatófito e principais transferências entre compartimentos ambientais (adaptado de (PIER, 2013)).

Os mecanismos moleculares envolvidos na acumulação de substâncias do solo iniciam-se pela mobilização dos iões pela secreção de quelatos e acidificação da rizosfera. A incorporação é feita pelos sistemas da membrana plasmática (Schmidt, 1999). Ao entrar na raiz pelo fluxo de água, o composto pode seguir três vias possíveis: via apoplástica através das paredes das células, via simplástica através do plasmodesmo ou via transcelular a partir do vacúolo. O composto pode evitar a entrada nas células ao mover-se no apoplasto até atingir a endoderme. Todas as moléculas são obrigadas a atravessar as membranas plasmáticas e alcançar o xilema, requerendo um transporte ativo para compostos hidrofóbicos (Hellström, 2004). Após atingirem as folhas, são capturados por várias células foliares, ocorrendo o armazenamento preferencialmente nos tricomas (Clemens *et al.*, 2002).

Compostos orgânicos podem atingir a superfície das plantas como moléculas de vapor livres, dissolvidos em gotas de água ou sorbidos a partículas. Os compostos depositados podem ser incorporados em lípidos cuticulares, difundidos através da membrana lipídica ou transportados pelo floema, ou podem penetrar na planta através dos estomas como um gás (Hellström, 2004). A morfologia das folhas, a sua idade, estrutura, posição, exposição ao sol, danificação da planta e

aspectos ambientais fazem variar a capacidade em capturar os compostos presentes na atmosfera (Fernández, 2009).

Na orla costeira, os ambientes mais favoráveis ao crescimento de plantas são os cordões dunares. Estes sistemas encontram-se divididos em praia alta, duna embrionária, duna primária, duna secundária e duna estabilizada, tal como esquematizado na Figura 1.2. Na praia alta a vegetação é muito reduzida devido à instabilidade das areias e ação do mar. A acumulação de areias em torno das plantas forma a duna embrionária (Martins *et al.*, 2013). A duna primária tem uma cobertura pouca densa de vegetação e sofre oscilações na superfície, enquanto a duna secundária é mais estável e agrupa condições mais favoráveis de crescimento e proliferação de plantas. Na duna estabilizada a influência da salinidade é mínima e as areias são estáveis, permitindo o crescimento de plantas em altura e a acumulação de húmus no solo (Acosta *et al.*, 2009).

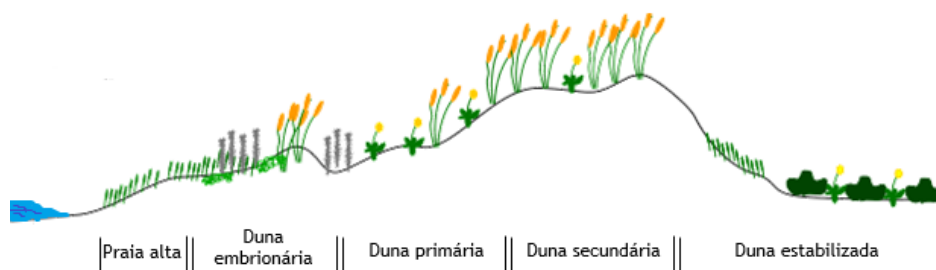


Figura 1.2 - Geomorfologia de um sistema dunar (adaptado de (Geira, 2016)).

Optou-se por centrar este estudo apenas na região do litoral dos concelhos do Porto, mais concretamente nas praias de Matosinhos e Vila Nova de Gaia. Como a costa do Porto é rochosa, a proliferação de plantas é escassa, ao invés dos ambientes costeiros de Matosinhos e Vila Nova de Gaia, que apresentam uma costa baixa rochosa e arenosa, com existência de cordões dunares em algumas praias (apenas de Gaia) e proliferação de vegetação dunar. As praias de Matosinhos situam-se entre estruturas rochosas, com pequenos aglomerados de areia, mas sem a existência de um sistema dunar propriamente dito. A costa de Vila Nova de Gaia é rochosa desde a foz do rio Douro até à praia de Lavadores, começando a partir daí uma costa muito mais arenosa e com notáveis cordões dunares que se estendem até Espinho (Correia & Fidalgo, 1995). As recolhas das amostras foram efetuadas para este estudo ao longo de todo o sistema dunar, desde a praia alta até à duna estabilizada.

No litoral Norte de Portugal Continental, existem variadas espécies de plantas dunares, que para além de terem de tolerar submersões temporárias por água do mar, também têm de suportar o enterramento por areias. Poucas são as plantas que vivem em permanência na praia alta, sendo a maioria das plantas anuais (germinam, florescem e morrem no período de um ano), desenvolvendo-se apenas na primavera/verão e sobrevivendo ao inverno sob a forma de sementes, após morrerem (Gomes *et al.*, 2002). É importante, por isso, verificar as características destas plantas e a sua capacidade em acumular compostos químicos de modo a perspetivar o seu uso como bioamostradores (Anexo 2). Os estudos relativos à bioacumulação por parte das espécies vegetais

também presentes nos litorais de Matosinhos e Gaia são ainda muito escassos, como revela o Anexo 2, havendo provas de que apenas 4 espécies acumulam compostos químicos, essencialmente elementos metálicos.

A maioria das plantas é vivaz, podendo sobreviver mais do que dois anos. As plantas anuais também são em número significativo e dificultam a sua identificação pois morrem ao fim de um ano ou menos. As plantas colonizam as areias a diferentes distâncias do mar, segundo as suas características, levando a que as que se situam nas dunas estabilizadas e mais distantes do mar, sejam as que têm melhores condições de se propagarem. Segundo as suas características pode-se verificar que há plantas que apresentam pelos nos seus caules e folhas parcialmente expandidas facilitando a captação de partículas e compostos hidrofílicos, por maior adesão a resinas foliares (Fernández, 2009). Espécies com cutículas mais espessas, isto é, folhas carnudas e espessas, conseguem captar maiores concentrações de compostos lipofílicos, pois absorvem concentrações mais elevadas destes compostos (Forster *et al.*, 2006).

Para se quantificar as concentrações de *musks* e filtros-UV nestas plantas é necessário desenvolver-se métodos de análise, como se apresenta de seguida.

1.5 Métodos analíticos para a determinação de filtros-UV e *musks* na vegetação

As espécies vegetais da orla costeira são uma via de entrada de contaminantes através de processos de acumulação. A concentração de poluentes que uma dada amostra contém pode ser determinada através de métodos analíticos. Estes consistem na aplicação de diferentes técnicas - extração, *clean-up*, pré-concentração e análise instrumental - de modo a que seja possível identificar e quantificar os compostos de interesse.

O desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação de filtros-UV (Ramos *et al.*, 2015) e *musks* sintéticos (Brausch & Rand, 2011) tem sido frequente em matrizes aquosas, solos, sedimentos e biota (principalmente em peixes). As principais técnicas aplicadas, nomeadamente na análise destes compostos em plantas, serão discutidas em maior pormenor nas secções seguintes.

1.5.1 Técnicas de extração e *clean-up*

A extração é uma etapa importante e essencial no procedimento analítico envolvendo matrizes vegetais, sendo as técnicas mais usadas na literatura a *Soxhlet* e *Soxtec*. Como estas requerem grandes quantidades de solventes e tempo, as alternativas que têm sido usadas são a extração ultrassónica com solventes (USE) e a digestão ultrassónica enzimática assistida (USAED). Outras alternativas são ainda a extração com líquido pressurizado (PLE) e a extração com fluido supercrítico (SFE) (Matamoros *et al.*, 2012).

A técnica de extração *Soxhlet*, foi a técnica mais usual durante mais de um século, sendo atualmente a referência para outros métodos de extração. Na técnica convencional, a amostra é colocada num cartucho que durante a operação é enchido com solvente condensado do balão de destilação (Luque de Castro & García-Ayuso, 1998). Quando o líquido atinge o nível de transborde,

um sifão aspira o soluto e descarrega-o de volta no balão de destilação, levando o extrato resultante. Este processo é repetido até a extração estar completa (Hawthorne *et al.*, 2000). Esta técnica apresenta como maiores vantagens expor a amostra a um contato permanente com porções frescas de solvente, não necessitar de filtração, possibilitar a extração em paralelo e ser uma metodologia simples. As principais desvantagens são o tempo de extração elevado, grande quantidade de solvente desperdiçado, possibilidade de decomposição térmica da amostra, falta de agitação e necessidade obrigatória de um passo posterior de evaporação/concentração (Manirakiza *et al.*, 2001).

A técnica de extração *Soxtec* tornou-se recentemente muito usada para a extração de compostos presentes em vegetais, sendo a operação a mesma do *Soxhlet* e o sistema *Soxtec* mais rápido e automatizado, com menor consumo de solvente (Matsler & Siebenmorgen, 2005). O *Soxtec* é um procedimento com dois passos, envolvendo uma etapa de ebulição após a secagem da amostra e uma etapa de lavagem da amostra com secagem posterior dos extratos. Estes passos reduzem o tempo total de extração fazendo com que esta técnica seja aplicada para extrair contaminantes organoclorados de amostras sólidas (Sporring *et al.*, 2005).

A extração ultrassônica com solventes (USE) proporciona um contato eficiente entre a amostra e o solvente, sendo uma técnica eficaz na preparação de amostras para análise de diversos compostos e permite obter excelentes resultados sem necessidade de *clean-up* (Pan *et al.*, 2008). Este método consiste em colocar a amostra e o solvente num recipiente apropriado, imergi-lo num banho ultrassônico onde a vibração ultrassônica maximiza o contato entre o solvente e a amostra, levando à extração dos analitos (Mitra, 2003). A cavitação acústica, a função mecânica e a função térmica têm efeito direto na eficiência da extração, sendo a cavitação o fator mais significativo. As vantagens deste método incluem alta eficiência, menores custos dos equipamentos, facilidade de operação, pouca preparação da amostra e temperaturas mais baixas de extração (Aydin *et al.*, 2006).

A digestão ultrassônica enzimática assistida (USAED) é reconhecida por ser uma técnica simples, robusta e rápida, sendo usada recorrentemente na extração de metais e metaloides (Vale *et al.*, 2008). A digestão enzimática de amostras sólidas é feita por incubação seguida de agitação da mistura com amostra e enzima num meio tamponado, finalizando-se o procedimento num banho ultrassônico que aumenta a taxa de reação (Priego-Capote & de Castro, 2007). Vários fatores afetam a eficiência do USAED como o pH e temperatura, razão substrato/enzima, procedimentos de limpeza, envelhecimento da enzima, dispositivo de produção de som (diferenças de intensidade), amplitude e tempo de exposição ao som (4 min é suficiente para que haja extração eficiente) e tipo de material de suporte da amostra (Vale *et al.*, 2008).

A extração com líquido pressurizado (PLE) ou extração acelerada por solvente (ASE) é uma técnica de extração com princípios semelhantes à extração *Soxhlet*, mas que recorre a uma temperatura e pressão elevada, completando a extração num curto período de tempo e com uma pequena quantidade de solvente (Gan *et al.*, 1999). Na execução do método é usado um forno

equipado com controlador de temperatura, onde a célula de extração é colocada (Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2016). A eficiência deste método é geralmente melhor do que a do *Soxhlet* (Gan *et al.*, 1999).

A extração com fluido supercrítico (SFE) apresenta uma transferência de massa mais favorável que as extrações convencionais porque tem maiores coeficientes de difusão dos solutos nos fluidos supercríticos e menor viscosidade (Kanel & Marentis, 1999). Para além disso os fluidos supercríticos são económicos e livres de contaminantes. O fluido superficial converte-se em gás e as espécies extraídas condensam no estado líquido ou sólido (Wai & Laintz, 1994). Baseia-se no princípio das solubilidades num fluido supercrítico aumentarem significativamente com o aumento da densidade e os diferentes solutos terem diferentes solubilidades nas mesmas condições. O fluido supercrítico pode ser removido facilmente após a extração, baixando a temperatura ou pressão, ou ambos (Mitra, 2003).

Uma técnica recentemente desenvolvida foi a extração por sorção numa barra de agitação (SBSE), com a barra de agitação revestida normalmente com polidimetilsiloxano (PDMS). Apresenta como vantagens ter uma alta sensibilidade e aplicar-se a vários compostos, incluindo compostos aromáticos voláteis e fragrâncias (Tan *et al.*, 2008). A extração é efetuada colocando uma quantidade apropriada de amostra e solvente num recipiente onde se coloca a barra de agitação num devido suporte acima da amostra sólida, com agitação tipicamente entre 30-240 min e aquecimento num banho de água. Após a extração a barra é colocada numa unidade de dessorção térmica ou química (David & Sandra, 2007).

Na microextração da fase sólida (SPME), uma fibra de sílica fundida é revestida por uma fase estacionária, que é exposta a uma amostra líquida ou gasosa até que se atinja o equilíbrio entre os analitos na amostra e na fibra. As amostras sólidas não podem ser diretamente extraídas pelo SPME, exigindo a partição dos analitos para a fase gasosa através do aquecimento da amostra sólida ou para a fase líquida preparando uma suspensão da amostra num solvente (Prosen & Zupančič-Kralj, 1999). As principais vantagens desta técnica são a sua capacidade em prevenir efeitos de matriz na separação cromatográfica, simplicidade e facilidade de uso e reduzido ou inexistente consumo de solvente (Yang & Pawliszyn, 1994).

Desde a sua introdução em 1989, a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) tem sido citada como método de extração em várias publicações, tendo-se provado como uma técnica eficiente e genérica para o isolamento de várias substâncias de amostras de plantas e animais (Barker, 2007). Os principais passos desta extração são: a amostra é misturada com o material dispersante num almofariz com um pilão; a mistura homogeneizada é transferida para um cartucho de extração em fase sólida (SPE); eluição com um solvente adequado com o auxílio de uma bomba de vácuo, para um frasco que contenha o eluato para ser analisado (Capriotti *et al.*, 2010).

O *clean-up* é muitas vezes necessário a seguir à extração. Este consiste numa etapa de limpeza, tentando libertar a matriz de substâncias não desejáveis (LeDoux, 2011). Algumas técnicas têm sido desenvolvidas para eliminar as interferências (compostos co-extraídos), como por exemplo

a cromatografia de permeação em gel (GPC) e a extração da fase sólida (SPE). A técnica de *clean-up* de extração da fase sólida (SPE) baseia-se na remoção de compostos químicos da fase líquida através da sua retenção em sorbentes e recuperação de determinados compostos por eluição com solventes apropriados. Consiste em quatro etapas: acondicionamento da coluna/cartuchos, retenção dos analitos presentes na amostra, lavagem posterior da coluna/cartuchos e dessorção dos analitos de interesse. A etapa de acondicionamento é usada para preparar a fase estacionária e a lavagem posterior para remover contaminantes indesejados (Mitra, 2003). A utilização deste método depende das propriedades dos analitos, natureza da matriz e tipo de cromatografia envolvida (Hennion, 1999). A cromatografia de permeação em gel (GPC) é uma técnica bem estabelecida de *clean-up* de macromoléculas, evitando que pequenas quantidades das substâncias macromoleculares atinjam o eluato do GPC e possam interferir com a posterior análise. O *clean-up* da amostra é obtido através da eluição da amostra numa coluna de gel de sílica ativada e gel de sílica tratada com ácido, com adição de solvente, recolhendo-se apenas a fração com os analitos de interesse. As gorduras e clorofilas são geralmente maiores e, por isso, excluídas para o fluxo de resíduos. As vantagens deste método prendem-se com o tempo e baixo consumo de solventes e sorbentes uma vez que as colunas podem ser reutilizadas, e podem ser renovadas caso ocorra alguma contaminação (Thomas *et al.*, 1998).

Um método recentemente concebido e que tem sido testado é o denominado QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), criado em 2003 com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos disponíveis à data (Prestes *et al.*, 2009). Baseia-se na extração a uma microescala, usando um solvente orgânico (usualmente, acetonitrilo) e purificando o extrato através de uma extração dispersiva em fase sólida (Wilkowska & Biziuk, 2011) - combinação de extração com *clean-up*. Neste método adiciona-se um solvente orgânico à amostra sólida e a extração ocorre com auxílio de um banho de ultrassons (Anastassiades & Lehotay, 2003). Os sais que são introduzidos de seguida no sistema, têm como função induzir a separação de fases, sendo muito usado o sulfato de magnésio como agente exsicante e para facilitar a partição de analitos polares para a fase orgânica. Com a adição de cloreto de sódio ou acetato de sódio é possível aumentar a polaridade da fase aquosa, favorecendo a extração dos compostos para a fase orgânica. O acetato de sódio pode ainda ser utilizado para controlar o pH do meio, evitando que haja degradação de compostos por efeito da variação de pH ou que haja alguma modificação da estrutura dos compostos a analisar. O conjunto destes sais constitui o primeiro QuEChERS. Um segundo QuEChERS é normalmente efetuado como etapa de *clean-up*, consistindo numa extração dispersiva da fase sólida ao invés do usual SPE, permitindo poupar tempo, esforço, dinheiro e solventes em comparação com a técnica convencional de SPE. Os sorbentes normalmente usados são um polímero contendo na sua estrutura uma amina primária e secundária (PSA) para remover ácidos gordos e açúcares, *Graphitized Carbon Black* (GCB) para remover as clorofilas e sílica trifuncional polimericamente ligada C₁₈ para a remoção de lípidos (Wilkowska & Biziuk, 2011). Para aumentar o contato entre as partículas dos sais ou sorbentes e o solvente, os tubos são sempre levados a agitação no *vortex*. Em relação a outros métodos convencionais, o QuEChERS apresenta elevadas recuperações para um

grande número de compostos, é exato e preciso, permite a preparação de várias amostras em simultâneo com necessidade de pouco tempo, utiliza pouco volume de solventes, não requer a utilização de muitos materiais e equipamentos (Prestes *et al.*, 2009) e por ser efetuado em tubos fechados diminui a probabilidade de contaminações cruzadas. Por ser um método recente e que tem revelado grandes potencialidades na extração de substâncias voláteis de amostras sólidas e também por já se terem realizado com êxito trabalhos no laboratório com este método, adotou-se esta técnica para a extração de *musks* sintéticos e filtros-UV de plantas dunares neste estudo.

Os métodos de extração e *clean-up* que constam nesta secção são implementados de modo a que ocorra a extração dos analitos alvo das amostras sólidas. Após esta etapa, os extratos são analisados através de métodos instrumentais de análise. Entre as várias técnicas disponíveis, a cromatografia gasosa seguida de deteção por espectrometria de massa revela-se a mais apropriada para a análise de compostos semivoláteis como os *musks* sintéticos e os filtros-UV selecionados neste estudo.

1.5.2 Método instrumental

Devido às propriedades dos *musks* e filtros-UV, a cromatografia gasosa com auxílio da espectrometria de massa tem sido usada por vários autores de estudos envolvendo a análise destes compostos. Esta combinação é usada para identificar e quantificar compostos orgânicos voláteis ou semivoláteis em misturas complexas e obter informação estrutural e isotópica, bem como efetuar uma análise qualitativa ou quantitativa. A cromatografia gasosa (GC) permite separar eficientemente misturas complexas e a espectrometria de massa (MS) consegue detetar esses compostos, fazendo com que a combinação das duas técnicas de análise leve a um desempenho estável e boa reprodutibilidade, pois ambas podem ser executadas nas mesmas condições e serem conectadas por uma interface muito simples (Xue *et al.*, 2015). Os compostos orgânicos têm de estar em solução para serem injetados no GC, sendo comum sensibilidades do método de 1 a 100 pg por componente, dependendo do método de ionização. O tempo de análise usualmente ronda os 20 a 100 min (Hites, 1997). Os principais componentes do equipamento de GC-MS estão presentes na Figura 1.3.

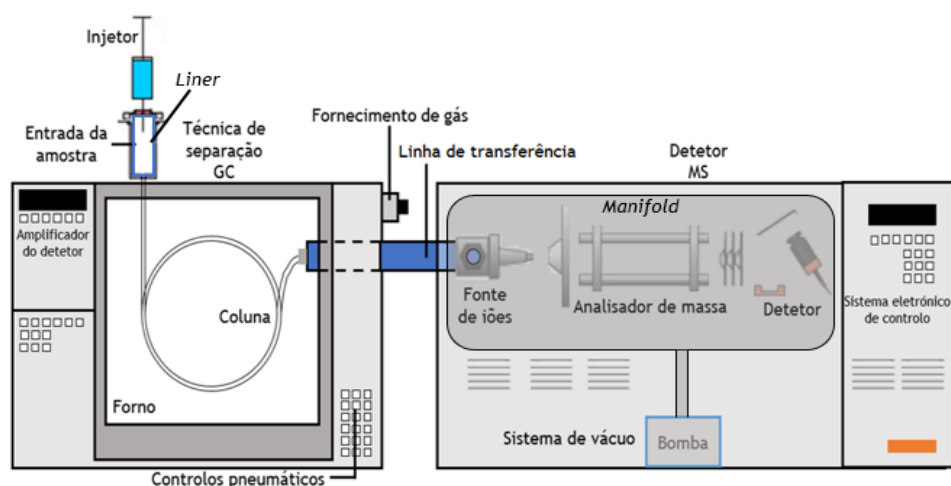


Figura 1.3 - Diagrama processual do GC-MS.

O GC-MS tem como limitações gerais dificuldade em determinar a substituição posicional em anéis aromáticos e alguns compostos isoméricos não poderem ser distinguidos por espectrometria de massa, apesar de poderem ser separados por GC. A precisão é restringida por estas limitações, sendo a exatidão controlada pela calibração do método analítico, que usando padrões isotópicos internos pode atingir um desvio de $\pm 20\%$ (Hites, 1997).

Todas as formas de cromatografia envolvem a partição de um composto entre a fase móvel e a fase estacionária, sendo a fase móvel no GC, o gás de arraste e, a fase estacionária, um líquido imóvel de alta massa molecular ligado quimicamente às paredes internas da coluna cromatográfica. O sistema de injeção é o sistema mais crítico do GC, pois converte as amostras líquidas em gasosas, sendo o modelo *split/splitless* (repartição/sem repartição) o mais usual. Na injeção em modo *split* apenas uma parte da solução vaporizada é introduzida na coluna cromatográfica. No modo *splitless*, toda a solução vaporizada é encaminhada para a coluna cromatográfica. Neste tipo de injetor, ocorre a evaporação rápida da amostra numa pequena câmara aquecida revestida no interior por vidro (*liner*), sendo depois as substâncias voláteis transferidas para a coluna sobre a ação do gás de arraste (Xue *et al.*, 2015). Muitos dos equipamentos mais recentes utilizam *autosamplers*, sem necessidade de assistência de um técnico, para a injeção das amostras. O gás de arraste inerte mais utilizado para conduzir os compostos extraídos presentes na fase gasosa ao longo da coluna GC é o hélio por apresentar maior condutividade térmica que outros gases e baixa densidade, permitindo a utilização de caudais mais elevados (Ewing, 1998). O gás de arraste é proveniente do cilindro de compressão de gás e o seu caudal controlado pelos reguladores de pressão e caudal, sendo a pureza e o fornecimento do gás aspetos importantes para que não ocorram “picos fantasma” no cromatograma, nem se danifique a coluna cromatográfica (Clement & Taguchi, 1991). As colunas cromatográficas podem ser empacotadas ou capilares e têm pior tolerância às elevadas temperaturas quanto maior for a polaridade na coluna. As colunas capilares são mais usadas por apresentarem maior eficiência. A coluna deve conter comprimento suficiente para ocorrer uma separação significativa. A temperatura na coluna é tal para que se mantenham os compostos no estado gasoso, sendo comum a aplicação de programas de temperatura quando a amostra contém vários analitos com diferentes pontos de ebulição (Ewing, 1998).

Como demonstra a Figura 1.3, a amostra após ser injetada, entra na coluna situada no forno do GC para permitir uma boa separação dos compostos e segue depois para a linha de transferência que liga o GC ao detetor MS. A espectrometria de massa (MS) é a técnica de deteção de compostos mais versátil e funciona inicialmente com a entrada das moléculas provenientes do GC na câmara aquecida sob vácuo (*manifold*) do MS, para evitar que as moléculas colidam e reajam, onde primeiramente são ionizadas e fragmentadas por uma fonte de ionização. Existem principalmente dois tipos de fontes de ionização: a ionização eletrónica (EI) e a ionização química (CI), sendo a EI mais utilizada por originar maior número de fragmentos. Na ionização eletrónica os eletrões são emitidos por um filamento aquecido de rénio ou tungsténio e acelerados aplicando normalmente uma corrente de 70 eV entre o filamento e o ânodo. O feixe de eletrões energéticos emitido, atinge as moléculas da amostra, ionizando-as com a perda de um eletrão devido à repulsão eletrostática

(Ewing, 1998). O MS apenas consegue detetar os catiões e catiões radicais. As moléculas ionizadas atingem o analisador de massa que as separa de acordo com a sua razão m/z , com as moléculas de maior massa a serem libertadas primeiramente (Xue *et al.*, 2015). Existem vários analisadores de massa como o quadrupolo, triplo quadrupolo e *ion trap*, sendo este último o utilizado neste estudo. Um *ion trap* contém 3 elétrodos que capturam os fragmentos formados e os liberta no detetor por redução do potencial. É constituído por superfícies hiperbólicas, elétrodo central e dois elétrodos adjacentes, como demonstra a Figura 1.4. A libertação dos iões do *trap* dá-se após a aplicação de uma determinada frequência que torne os iões de uma certa razão m/z instáveis (Wong, 1997).

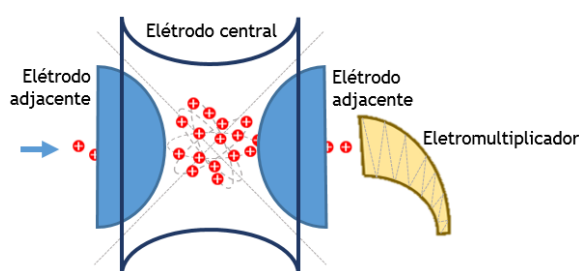


Figura 1.4 - Diagrama do funcionamento de um analisador de massa *ion trap*.

O *ion trap* varia os campos elétrico e magnético, de modo a que as trajetórias dos iões capturados de razões m/z consecutivas se tornem sequencialmente instáveis e tenham que abandonar o analisador de massa de acordo com a sua razão m/z . A deteção ocorre num eletromultiplicador que amplia o sinal gerado por fragmentos de carga positiva, devido à cascata de eletrões que se forma com o contato destes com a superfície interna do detetor. Ao se corresponder o tempo de retenção do GC com o componente da amostra e o seu espectro de massa com as do composto de referência analisado sobre as mesmas condições, obtém-se uma identificação positiva do composto (Clement & Taguchi, 1991).

A recolha de dados é efetuada por um sistema de acumulação de dados, donde se originam resultados a 3 dimensões (tempo em função da abundância e da razão m/z) bem como a 2 dimensões (cromatogramas e espectros de massa) (Hites, 1997). A aquisição de dados num espectrómetro de massa *ion trap* é efetuado pelo sistema de armazenamento dos iões selecionados (SIS), sendo o *full-scan* outro método utilizado. Um cromatograma *full-scan* é o somatório das intensidades de todas as massas dos fragmentos num dado tempo, enquanto no modo SIS, apenas as gamas m/z selecionadas são detetadas. A operação no modo SIS aumenta a sensibilidade do método para os iões selecionados, levando a limites de deteção mais baixos.

2 Estado da arte

Os estudos sobre a detecção de *musks* sintéticos e filtros-UV nas espécies vegetais têm sido raros, centrando-se a maioria dos estudos na sua determinação em matrizes aquosas, solo, sedimentos e em peixes de rio (Amine *et al.*, 2012; Balmer *et al.*, 2005; Barón *et al.*, 2013; Bratkovics & Sapozhnikova, 2011; Chase *et al.*, 2012; Clara *et al.*, 2011; Jurado *et al.*, 2014; Matamoros *et al.*, 2012; Nakata *et al.*, 2009; Negreira *et al.*, 2010; Ramirez *et al.*, 2009; Tsui *et al.*, 2014; Vallecillos *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011). No entanto, tanto quanto é do conhecimento do autor, ainda não foi publicado até à data, informação sobre a existência de *musks* e filtros-UV na vegetação das zonas costeiras. O estado da arte deste tema, centra-se então, em publicações já efetuadas sobre a detecção destes compostos em espécies vegetais.

É essencial assim resumir os resultados dos estudos, incluindo os compostos analisados, os métodos de extração e *clean-up* e o método instrumental usados, os limites de detecção, quantificação e as recuperações obtidas, e as concentrações detetadas. A comparação dos métodos analíticos quanto ao tempo de operação, quantidade de solvente necessário e recuperações obtidas poderá levar a uma conclusão quanto ao método mais eficiente para analisar os compostos de interesse.

2.1 Determinação de *musks* em espécies vegetais

Analisando a Tabela 2.1 pode-se verificar que os 14 casos apresentados têm origem em 8 artigos científicos diferentes. Os métodos de extração variam de estudo para estudo, sendo usados a extração ultrassónica com solvente (USE), a extração por sorção numa barra de agitação (SBSE) com e sem dessorção térmica (TD), a microextração em fase sólida *in vivo* (SPME *in vivo*), QuEChERS, dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), extração com líquido pressurizado (PLE) e extração por *Soxhlet*.

A presença de 5 *nitromusks* e 6 *musks* policíclicos em agulhas de pinheiro provenientes de 3 locais diferentes de Portugal foi estudada por Silva *et al.* (2015). Depois de as amostras serem cortadas em pequenos pedaços, estas foram extraídas por USE. A extração foi executada com 100 mL de uma mistura de hexano/diclorometano (1:1) num banho de ultrassons por 30 min. A etapa de *clean-up* foi executada por coluna de SPE, seguida por GPC. O SPE foi executado em colunas de vidro contendo 5 g de *Florisil*[®] e no topo sulfato de sódio anidro. Os compostos de interesse foram eluídos com uma mistura de hexano/diclorometano (1:1). O GPC foi efetuado como etapa adicional de *clean-up*. O extrato proveniente do SPE foi transferido para colunas preparadas com 6 g de *Bio-Beads*[®] S-X3 pré-expandidas em hexano/diclorometano (1:1) e os compostos-alvo eluídos com 40 mL da mesma mistura de solventes, com os primeiros 15 mL a serem descartados. Daqui se conclui que este método é muito dispendioso, tendo em conta a quantidade de reagentes necessária. A análise foi efetuada por GC-MS. As percentagens de recuperação foram, para a maioria dos compostos, acima dos 80%. Os *musks* que apresentaram concentrações detetáveis em todos os locais de

amostragem foram o DPML (0,215-72,599 ng/g dw), ADBI (0,093-0,294 ng/g dw), HHCB (15,944-216,364 ng/g dw) e AHTN (2,028-8,919 ng/g dw).

A análise da ocorrência de 2 *nitromusks* e 6 *musks* policíclicos em vegetais (pimenta, alface e cenoura) provenientes de um supermercado de Bilbao, em Espanha, foi efetuada por Aguirre *et al.* (2014). O método de extração usado foi o SBSE-TD sem necessidade de *clean-up*, ocorrendo a análise no GC-MS. Para a extração dos compostos de interesse das plantas executou-se um pré-tratamento onde se deixou as amostras repousarem por 1 semana. O SBSE baseou-se na adição de 9 mL de água/metanol (80:20, v/v) para um recipiente já com 0,5 g de amostra, introduzindo-se depois a barra de agitação de polidimetilsiloxano (PDMS), com a extração a ocorrer num banho de água a 40 °C e agitado a 600 rpm por 3 horas. Na dessorção térmica, as barras de agitação foram dessorbidas a 300 °C durante 10 min. As desvantagens de todo este procedimento provêm do tempo requerido para preparar a amostra e para a etapa de extração. As recuperações foram acima de 75% para todos os compostos nos 3 vegetais estudados. A maioria dos *musks* não foram detetados nestes vegetais, sendo exceção o MA (0,07 ng/g) e AHTN (3,7 ng/g) para a pimenta, o MK (0,030 ng/g), AHTN (0,4 ng/g) e HHCB (0,4 ng/g) para a alface e o ADBI (0,04 ng/g) para a cenoura.

Plantas próximas de locais onde se situam poços de captação de água subterrânea foram utilizadas para a deteção de *musks* sintéticos por Chase *et al.* (2012). As amostras foram recolhidas no verão na localidade de Lubbock, Texas, Estados Unidos da América. A técnica de extração e *clean-up* utilizada foi o SBSE, sendo o método de análise o GC-MS. A amostra foi preparada colocando-se 1 g de matéria seca num filtro de café, simulando um “saco de chá”, no topo de um vial de 45 mL. Foram adicionados 15 mL de metanol (5 mL de cada vez), levando depois o vial a agitar durante 24 h. O filtro foi lavado com 15 mL de água diluindo o extrato para um total de 30 mL. O filtro com a amostra foi retirado e adicionou-se a barra de PDMS, deixando-se agitar durante 96 h a 1200 rpm. A dessorção da barra ocorreu com 2 mL de acetona/hexano (1:1, v/v) por 1 h. Este processo revelou-se muito demorado. Os limites de deteção e quantificação foram respetivamente de 2 e 10 ng/g para os compostos analisados nas plantas (HHCB e AHTN). O artigo não fornece dados sobre a recuperação obtida para cada composto. Os compostos em estudo não foram detetados nas amostras.

A técnica de extração SPME *in vivo* foi usada por Chen *et al.* (2015) para verificar a presença do MX, MK, HHCB e AHTN quer nas raízes, quer nas folhas da planta aloé vera (*Aloe chinensis Baker*) com 3 meses de idade. As plantas foram transferidas para um ambiente hidropónico em vários recipientes com 1 L de água da torneira por 2 meses antes da experiência (12:12 h luz/escurecimento, 25 °C). Para minimizar as variações no metabolismo das plantas, estas foram colocadas durante uma semana numa estufa a 25 °C com 25-50% de humidade. O método de extração SPME *in vivo* consistiu na injeção de uma agulha hipodérmica para depois se colocar a fibra SPME de PDMS, quer nas raízes como nas folhas, com as raízes a serem lavadas com água destilada durante 30 s antes da colocação da fibra. A fibra foi retirada ao fim de 10 min, sendo lavada e enxaguada para depois se colocar no GC-MS. As concentrações dos compostos analisados, quer nas folhas como nas raízes, variaram entre

0 e 16 ng/g ao longo de mais de 150 horas para as folhas e entre 0 e 27 mg/g ao longo de mais de 150 horas para as raízes. O método exige longo período de preparação da amostra.

A análise da captação dos *musks* policíclicos HHCB e AHTN, entre outros compostos, por plantas foi também efetuada por Macherius *et al.* (2012). As plantas usadas foram a cenoura, a cevada e a festuca dos prados (*Festuca pratense*) cultivadas pelos autores numa estufa, num solo preparado especificamente para a experiência e com *spike* dos compostos a analisar. Os materiais das plantas foram recolhidos durante 2 meses de vários vasos, juntando-se todas as raízes recolhidas e folhas da mesma planta. Após a colheita, as cenouras foram divididas em casca da raiz, núcleo da raiz e folhas, enquanto a cevada e a festuca foram apenas divididas em raiz e folhas. As amostras secas foram trituradas para se obter um refinado com 0,2 mm. As amostras foram extraídas com a metodologia de QuEChERS, utilizando 10 mL de acetato de etilo/acetona (1:1 v/v) como solvente para permitir o uso do GC-MS. Usaram-se 2 g de amostra para as raízes e 1 g para as folhas e o *clean-up* ocorreu utilizando *Supelclean ENVI-Carb* e PSA. Com este método os dois compostos foram detetados em todas as plantas (810-12660 ng/g) e obtiveram-se percentagens de recuperação superiores a 60% para os compostos presentes na cenoura e na cevada. O método de extração revelou-se rápido, com pouco uso de solventes e com recuperações perto de 100%, principalmente para a cenoura.

Um método analítico para determinar o AHTN na alface usando PLE e GC-MS foi testado por Calderón-Preciado *et al.* (2009). A alface foi obtida num supermercado local de Barcelona, Espanha. 500 g foram triturados com o auxílio de azoto líquido e 0,5 g foram transferidos para um almofariz de porcelana. O PLE foi usado após um procedimento de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), onde 1 g de *Florisil*[®] foi misturado com a amostra durante 8 min, e posteriormente com 0,2 g Na₂SO₄, 0,05 g citrato trissódico di-hidratado, 0,05 g NaCl, 0,02 g ácido cítrico dissódico com 1,5 moles de água e 3 g de *Hydromatrix* para se obter uma mistura homogênea, deixando-se a amostra repousar por 30 min. A extração com PLE foi efetuada colocando a mistura obtida numa célula de aço inoxidável de 11 mL, preenchendo o vazio com *Hydromatrix*. Os solventes de extração usados foram acetona/hexano (1:1) e acetato de etilo/hexano em proporções 2:1 e 1:1. A mistura de solventes foi transferida para a célula que, foi depois aquecida e pressurizada. O extrato após ser evaporado em azoto foi transferido (3 mL) para um *vial* com solução aquosa de 0,6% K₂CO₃, com a fase de hexano a ser percolada numa coluna de *Florisil*[®]-MgSO₄. Depois 3 mL de acetato de etilo e 75 µL de 5% HCl foram adicionados à fase aquosa recuperando-se a fase orgânica e percolando-a numa coluna de Na₂SO₄, sendo depois esta fração ácida e a fração neutra evaporadas e levadas a analisar no GC-MS. Com esta metodologia obtiveram-se recuperações de 87 a 106%, apesar da quantidade de solventes e sorbentes utilizados ser elevada.

A presença de HHCB e AHTN na folha de macieira e alfafa recolhidos em Espanha, em locais próximos a uma ETAR e a um rio (primavera e verão) foi comprovada por Calderón-Preciado *et al.* (2011). Apenas o HHCB foi detetado na alfafa (16,9 ng/g), ficando os restantes resultados abaixo do limite de deteção. O método de extração e *clean-up* foi o MSPD seguido de PLE, com acetona/hexano (1:1) e dois ciclos de extração durante 13,5 min a 104 °C, com a análise a ocorrer em GC-MS/MS. A

extração foi a mesma que foi usada por Calderón-Preciado *et al.* (2009) sem no entanto haver informação quanto aos valores de recuperação.

A captação de AHTN por parte do trigo plantado num solo irrigado com AHTN foi analisada por Chen *et al.* (2010). O método de extração usado foi o *Soxhlet* com o método instrumental a ser o GC-MS. A extração com *Soxhlet* ocorreu durante 24 h com uma mistura de diclorometano e *n*-hexano (3:1). O extrato sofreu uma mudança de solvente para *n*-hexano com um evaporador rotativo, reduzido de seguida para 1 mL. O extrato passou depois por um cartucho de vidro preenchido com algodão, 0,6 g de sulfato de sódio anidro e 1,0 g de gel de sílica, diluído com 10 mL de DCM. O eluato foi evaporado e dissolvido em 1 mL de *n*-hexano antes de ser inserido no GC-MS. Obtiveram recuperações superiores a 65% e um máximo de acumulação nas plantas de 70000 ng/g. O tempo de extração revela-se moroso.

O método de extração com menos gasto de solventes foi o SPME *in vivo* usado por Chen *et al.* (2015) apesar de ser dos mais morosos devido à necessidade de manter a planta viva em condições estáveis. As extrações PLE (Calderón-Preciado *et al.*, 2011; Calderón-Preciado *et al.*, 2009) e QuEChERS (Macherius *et al.*, 2012) foram as que se revelaram mais rápidas e com recuperações entre 63% e 106%. O SBSE-TD (Aguirre *et al.*, 2014) foi o método com valores de recuperação mais elevados (%Rec > 87%), tendo como desvantagem o tempo necessário para o pré-tratamento. A técnica de QuEChERS utilizada por Macherius *et al.* (2012) conduziu a recuperações entre 63% a 102%, com utilização de 10 mL de solvente e 3 sorbentes diferentes, apresentando-se como sendo um método rápido, pouco dispendioso e com bons resultados, atributos não igualáveis por nenhuma das restantes técnicas analisadas.

Tabela 2.1 - Sumário de parâmetros dos métodos analíticos usados para a determinação de musks em espécies vegetais

| Matriz | Compostos | Extração | Clean-up | Análise | LD (ng/g) | LQ (ng/g) | Rec (%) | Conc. (ng/g) | Época do ano | Local | Referência |
|---|-----------|--|--|---------|-------------|-------------|---------|---------------------|--------------|-----------------|--------------------------------|
| Vegetação (agulhas de pinheiro (<i>Pinus pinaster</i>)) n=3 | DPMI | USE (5 g amostra, Hex/DCM (1:1), 30 min) | SPE (5 g <i>Florisil</i> ®, Na ₂ SO ₄ , Hex/DCM (1:1)) e GPC (6 g <i>Bio-Beads</i> ® S-X3, Hex/DCM (1:1)) | GC-MS | 0,0732 (dw) | 0,2067 (dw) | 48-49 | 0,215-72,599 (dw) | ni | Portugal | (Silva <i>et al.</i> , 2015) |
| | ADBI | | | | 0,0046 (dw) | 0,0151 (dw) | 85-89 | 0,093-0,294 (dw) | | | |
| | HHCB | | | | 0,0129 (dw) | 0,0419 (dw) | 80-107 | 15,944-216,364 (dw) | | | |
| | AHMI | | | | 0,0038 (dw) | 0,0125 (dw) | 84-88 | nd | | | |
| | AHTN | | | | 0,0179 (dw) | 0,0578 (dw) | 82-84 | 2,028-5,587 (dw) | | | |
| | ATII | | | | 0,0218 (dw) | 0,0713 (dw) | 86-95 | nd-8,919 (dw) | | | |
| | MA | | | | 0,0050 (dw) | 0,0110 (dw) | 99-111 | nd | | | |
| | MK | | | | 0,0546 (dw) | 0,1820 (dw) | 82-103 | nd | | | |
| | MM | | | | 0,1143 (dw) | 0,3484 (dw) | 100-102 | nd | | | |
| | MT | | | | 0,0488 (dw) | 0,1626 (dw) | 100-104 | nd | | | |
| | MX | | | | 0,0530 (dw) | 0,1767 (dw) | 97-107 | nd | | | |
| Vegetação (pimenta (<i>Capsicum annuum</i>)) n=3 | MK | SBSE-TD (0,5 g amostra, água/metanol (80:20), barra PDMS, 40 °C, 600 rpm, 3 h; dessorção: 300 °C, 10 min) | GC-MS | ni | 0,01 | | 100 | nd | ni | Bilbau, Espanha | (Aguirre <i>et al.</i> , 2014) |
| | MA | | | | 0,01 | | 100-115 | 0,07 ± 0,01 | | | |
| | AHTN | | | | 0,01 | | 80 | 3,7 ± 0,1 | | | |
| | HHCB | | | | 0,3 | | 85 | nd | | | |
| | AHMI | | | | 0,1 | | 95-100 | nd | | | |
| | DPMI | | | | 0,01 | | 110 | nd | | | |
| | ATII | | | | 0,7 | | 80 | nd | | | |
| | ADBI | | | | 0,01 | | 75 | nd | | | |
| Vegetação (alface (<i>Lactuca sativa</i>)) n=3 | MK | SBSE-TD (0,5 g amostra, água/metanol (80:20), barra PDMS, 40 °C, 600 rpm, 3 h; dessorção: 300 °C, 10 min) | GC-MS | ni | 0,02 | | 100-105 | 0,030 ± 0,003 | ni | Bilbau, Espanha | (Aguirre <i>et al.</i> , 2014) |
| | MA | | | | 0,01 | | 80-95 | nd | | | |
| | AHTN | | | | 0,04 | | 90-110 | 0,4 ± 0,02 | | | |
| | HHCB | | | | 0,3 | | 85-100 | 0,4 ± 0,02 | | | |
| | AHMI | | | | 0,1 | | 75-120 | nd | | | |
| | DPMI | | | | 0,02 | | 95-120 | nd | | | |
| | ATII | | | | 0,8 | | 105-110 | nd | | | |
| | ADBI | | | | 0,03 | | 80-105 | nd | | | |
| Vegetação (cenoura (<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>)) n=3 | MK | SBSE-TD (0,5 g amostra, água/metanol (80:20), barra PDMS, 40 °C, 600 rpm, 3 h; dessorção: 300 °C, 10 min) | GC-MS | ni | 0,01 | | 75-110 | nd | ni | Bilbau, Espanha | (Aguirre <i>et al.</i> , 2014) |
| | MA | | | | 0,02 | | 80-110 | nd | | | |
| | AHTN | | | | 0,01 | | 105 | nd | | | |
| | HHCB | | | | 0,6 | | 80-95 | nd | | | |
| | AHMI | | | | 0,1 | | 85-100 | nd | | | |
| | DPMI | | | | 0,04 | | 85-95 | nd | | | |
| | ATII | | | | 0,8 | | 80-100 | nd | | | |
| | ADBI | | | | 0,01 | | 80-90 | 0,04 ± 0,004 | | | |

n - número de amostras; LD - limite de detecção; LQ - limite de quantificação; Rec - recuperação; Conc. - concentração; dw - peso seco; nd - não detetado; ni - não indicado

Tabela 2.1 - Sumário de parâmetros dos métodos analíticos usados para a determinação de musks em espécies vegetais (continuação)

| Matriz | Compostos | Extração | Clean-up | Análise | LD (ng/g) | LQ (ng/g) | Rec (%) | Conc. (ng/g) | Época do ano | Local | Referência |
|---|--------------------------|---|----------|---------|----------------------------|-----------|-----------|---|--------------|---------------------|----------------------------------|
| Vegetação (plantas de locais com poços de água) n=4 | HHCB AHTN | SBSE (1 g amostra, metanol, barra PDMS, 1200 rpm, 96 h; dessorção: acetona/hexano (1:1), 1 h) | | GC-MS | 2 2 | 10 10 | ni | nd nd | Verão | Lubbock, Texas, EUA | (Chase <i>et al.</i> , 2012) |
| Vegetação (raiz de aloé (<i>Aloe chinensis Baker</i>)) n=6 | HHCB MX AHTN MK | SPME <i>in vivo</i> (estufa: 1 semana, 25 °C, 25-50% humidade; fibra PDMS, 10 min) | | GC-MS | 9,8 11,3 8,6 13,2 | ni | ni | máx. 15 máx. 25 máx. 15 máx. 25 | ni | Guangzhou, China | (Chen <i>et al.</i> , 2015) |
| Vegetação (folha de aloé (<i>Aloe chinensis Baker</i>)) n=6 | HHCB MX AHTN MK | SPME <i>in vivo</i> (estufa: 1 semana, 25 °C, 25-50% humidade; fibra PDMS, 10 min) | | GC-MS | 3,0 6,8 5,1 6,2 | ni | ni | máx. 25 máx. 80 máx. 50 máx. 150 | ni | Guangzhou, China | (Chen <i>et al.</i> , 2015) |
| Vegetação (cenoura (<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>)) n=3 | AHTN HHCB | QuEChERS (2 g amostra, etil acetato/acetona (1:1), MgSO ₄ , <i>Supelclean ENVI-Carb</i> , PSA) | | GC-MS | ni | 50 20 | 97 102 | 2320 860 | ni | Alemanha | (Macherius <i>et al.</i> , 2012) |
| Vegetação (cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)) n=3 | AHTN HHCB | QuEChERS (2 g amostra, etil acetato/acetona (1:1), MgSO ₄ , <i>Supelclean ENVI-Carb</i> , PSA) | | GC-MS | ni | 20 20 | 65 63 | 6900 810 | ni | Alemanha | (Macherius <i>et al.</i> , 2012) |
| Vegetação (festuca dos prados (<i>Festuca pratense</i>)) n=3 | AHTN HHCB | QuEChERS (2 g amostra, etil acetato/acetona (1:1), MgSO ₄ , <i>Supelclean ENVI-Carb</i> , PSA) | | GC-MS | ni | ni | ni | 12660 1770 | ni | Alemanha | (Macherius <i>et al.</i> , 2012) |

n - número de amostras; LD - limite de detecção; LQ - limite de quantificação; Rec - recuperação; Conc. - concentração; dw - peso seco; nd - não detetado; ni - não indicado

Tabela 2.1 - Sumário de parâmetros dos métodos analíticos usados para a determinação de musks em espécies vegetais (continuação)

| Matriz | Compostos | Extração | Clean-up | Análise | LD (ng/g) | LQ (ng/g) | Rec (%) | Conc. (ng/g) | Época do ano | Local | Referência |
|---|--------------|---|----------|----------|-----------|-----------|-----------|--------------|---------------------|------------------------------|--|
| Vegetação (alface (<i>Lactuca sativa</i>)) n=3 | AHTN | MSPD (0,5 g amostra, <i>Florisil</i> ®, Na ₂ SO ₄ , Na ₃ -citrato di-hidratado, NaCl, Na ₂ H-citrato sesqui-hidratado, <i>Hydromatrix</i>) e PLE (<i>Hydromatrix</i> , acetona/hexano (1:1), etil acetato/hexano (2:1 e 1:1)) | | GC-MS | 18,2 | 27,4 | 87,0-106 | ni | ni | Barcelona, Espanha | (Calderón-Preciado <i>et al.</i> , 2009) |
| Vegetação (folha de macieira (<i>Malus domestica</i>)) n=4 | HHCB AHTN | MSPD (0,5 g amostra, <i>Florisil</i> ®, Na ₂ SO ₄ , Na ₃ -citrato di-hidratado, NaCl, Na ₂ H-citrato sesqui-hidratado, <i>Hydromatrix</i>) e PLE (<i>Hydromatrix</i> , acetona/hexano (1:1), 104 °C, 13,5 min) | | GC-MS/MS | ni | ni | ni | nd nd | Primavera/ Verão | Torroela de Montgri, Espanha | (Calderón-Preciado <i>et al.</i> , 2011) |
| Vegetação (alfafa (<i>Medicago sativa</i>)) n=4 | HHCB AHTN | MSPD (0,5 g amostra, <i>Florisil</i> ®, Na ₂ SO ₄ , Na ₃ -citrato dihidratado, NaCl, Na ₂ H-citrato sesquihidratado, <i>Hydromatrix</i>) e PLE (<i>Hydromatrix</i> , acetona/hexano (1:1), 104 °C, 13,5 min) | | GC-MS/MS | ni | ni | ni | 16,9 nd | Primavera/ Verão | Torroela de Montgri, Espanha | (Calderón-Preciado <i>et al.</i> , 2011) |
| Vegetação (trigo (<i>Triticum aestivum</i>)) n=3 | AHTN | <i>Soxhlet</i> (DCM/Hex (3:1), 24 h, MgSO ₄ , sílica, DCM) | | GC-MS | ni | ni | 65,0-85,4 | máx. 70000 | ni | Tianjin, China | (Chen <i>et al.</i> , 2010) |

n - número de amostras; LD - limite de detecção; LQ - limite de quantificação; Rec - recuperação; Conc. - concentração; dw - peso seco; nd - não detetado; ni - não indicado

2.2 Determinação de filtros-UV em espécies vegetais

Na Tabela 2.2 são apresentadas 5 situações onde se testemunhou a captação de filtros e estabilizadores UV por parte de plantas. Os métodos de extração e *clean-up* utilizados para determinar os compostos nas espécies vegetais foram o PLE e SPE.

Um estudo sobre a captação de benzotriazóis no milho e trigo recolhidos no verão de 2011 foi realizado por Lai *et al.* (2014). Nenhum dos compostos analisados foi identificado. O método de extração com PLE seguido de análise por GC-MS conduziu a uma recuperação para todos os compostos acima de 70%. Para a extração, um filtro de celulose foi colocado no fundo de cada célula do aparelho de PLE com 2 g de sílica gel. O método de extração baseou-se na adição de metanol-diclorometano (50:50, v/v) à amostra (2,0 g) colocada na célula. A extração ocorreu a uma temperatura de 120 °C, durante 2 ciclos de 5 min. Cada extrato foi evaporado até à secura e redissolvido em 1 mL de metanol para prosseguir para o GC-MS. A bioacumulação não se deu nas plantas devido à presença de matéria orgânica no solo e às propriedades hidrofóbicas dos benzotriazóis (Lai *et al.*, 2014).

A assimilação do benzotriazol por parte da planta *Arabidopsis thaliana* cultivada num meio hidropónico estéril por 14 dias em caixas com 30 sementes cada foi estudada por LeFevre *et al.* (2015). Após serem expostas a uma concentração de benzotriazol, as plantas foram recolhidas ao longo de 3 dias e depois ao longo de 8 dias. O método de extração (SPE com 200 mg de Oasis HLB) consistiu na adição de 1,0 mL de solução metanol/água (1:1) e levar a amostra a congelar durante 30 min a -80 °C. Após se descongelarem as amostras, estas foram levadas ao moinho de mistura (5 min), sonicação durante 10 min, *vortex* durante 1 min e centrifugação (10000 × g, 10 min). O sobrenadante foi removido e filtrado por um filtro de politetrafluoretileno (PTFE) para um *vial*. O procedimento foi repetido mais 2 vezes antes da análise em LC-MS/MS. O teste com o *spike* originou uma recuperação de 100,5%. A concentração máxima de BT detetada foi de 1,5 ng/caixa.

Os efeitos das variáveis ambientais na acumulação de benzotriazóis por parte do girassol foram analisados por Castro *et al.* (2004). As plantas foram cultivadas num meio hidropónico onde se adicionou 1-*H*-benzotriazol (BT) e 5-clorobenzotriazol (CIBT). Após o seu crescimento, foram movidas para uma solução de *Hoagland* com variação das condições do meio. A análise da captação destes compostos foi feita por HPLC, recolhendo 1 mL de amostra do meio, para se verificar que quantidade de benzotriazol foi capturada pelo girassol. A planta reduziu a concentração de benzotriazol de 30 mg/L até menos de 5 mg/L ao fim de 8 dias.

A armoracia (*Armoracia rusticana*) foi usada por Chen *et al.* (2016) para se verificar o metabolismo do BP3 colocado numa cultura de raiz transformada com a estirpe A4 de *Agrobacterium rhizogenes*. A planta cresceu num meio de *Murashige* e *Skoog* (meio de cultivo de células de plantas) contendo tiamina e inositol, durante 10 dias, sendo depois adicionado BP3 ao meio. O método de extração usado foi o SPE com o uso de 0,5 g de raiz e 1,5 mL de H₂O/acetonitrilo (30/70, v/v). As amostras foram ao *vortex* durante 1 min, ultrassons durante 5 min e centrifugadas durante 30 min

a 13000 × g. Depois o sobrenadante foi filtrado com filtro de seringa de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Este extrato foi purificado através de colunas SPE (60 mg *Oasis* HLB). Estas foram secas em vácuo durante 10 min para de seguida serem eluídas com acetonitrilo e levadas ao LC-MS. A armorácia conseguiu capturar 20% da concentração de BP3 inicialmente adicionada.

Os métodos para a extração de filtros-UV de plantas referidos na bibliografia contêm as desvantagens de serem morosos, pouco eficientes e com grande gasto de reagentes. O método apresentado por Lai *et al.* (2014) apresenta uma recuperação em geral superior a 70%, mas sem conseguir detetar com êxito nenhum dos compostos. Já o método de extração segundo LeFevre *et al.* (2015) utiliza pouca quantidade de reagentes e cerca de 3 h para extrair os compostos das plantas por SPE, usando, no entanto, um meio de cultura em água com necessidade de dias de cultivo da planta. Chen *et al.* (2016) utiliza o mesmo processo de extração (SPE) mas com um meio de cultivo da planta que exige muito solvente e alguns dias de espera. A análise de LeFevre *et al.* (2015) foi realizada em LC-MS/MS em vez de GC-MS usada no primeiro estudo, revelando-se adequada para um meio de cultura em água e compostos dissolvidos. O LC-MS foi usado por Chen *et al.* (2016) para a análise do BP3, um composto solúvel em água, justificando-se o método instrumental apesar de não ter sido apresentado o valor de concentração determinado.

Tabela 2.2 - Sumário de parâmetros dos métodos analíticos usados para a determinação de filtros-UV em espécies vegetais

| Matriz | Compostos | Extração | Clean-up | Análise | LD (ng/g) | LQ (ng/g) | Rec (%) | Conc. (ng/g) | Época do ano | Local | Referência |
|---|------------|---|--------------|---------|-----------|-----------|---------|----------------------|--------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| Vegetação (trigo (<i>Triticum aestivum</i>)) n=4 | UV326 | PLE | | | 1,68 | 5,59 | 71,4 | nd | Verão | Shandong, China | (Lai <i>et al.</i> , 2014) |
| | UV327 | (2,0 g amostra, | | | 0,40 | 1,34 | 97,0 | nd | | | |
| | UV328 | metanol/DCM | GC-MS | | 0,74 | 2,46 | 71,4 | nd | | | |
| | UV329 | (50:50), 120 °C, 2 | | | 0,44 | 1,48 | 96,2 | nd | | | |
| | UVP | ciclos 5 min) | | | 0,73 | 2,43 | 85,5 | nd | | | |
| Vegetação (milho (<i>Zea mays</i>)) n=4 | UV326 | PLE | | | 1,68 | 5,59 | 71,4 | nd | Verão | Shandong, China | (Lai <i>et al.</i> , 2014) |
| | UV327 | (2,0 g amostra, | | | 0,40 | 1,34 | 97,0 | nd | | | |
| | UV328 | metanol/DCM | GC-MS | | 0,74 | 2,46 | 71,4 | nd | | | |
| | UV329 | (50:50), 120 °C, 2 | | | 0,44 | 1,48 | 96,2 | nd | | | |
| | UVP | ciclos 5 min) | | | 0,73 | 2,43 | 85,5 | nd | | | |
| Vegetação (<i>Arabidopsis thaliana</i>) n=30 | BT | SPE (ni g amostra, metanol/água (50:50), <i>Oasis</i> HLB) | LC- MS/MS | | 16 ng/L | ni | 100,5 | máx. 1,5 ng/caixa | ni | Stanford, Califórnia, EUA | (LeFevre <i>et al.</i> , 2015) |
| Vegetação (girassol (<i>Helianthus anuus</i>)) n=3 | BT CIBT | ni | HPLC | | ni | ni | ni | ni | ni | Manhattan, Kansas, EUA | (Castro <i>et al.</i> , 2004) |
| Vegetação (armoracia (<i>Armoracia rusticana</i>)) n=2 | BP3 | SPE (0,5 g amostra, água/acetonitrilo (30:70), <i>Oasis</i> HLB, metanol, água) | LC-MS | | ni | ni | ni | 20 µM | ni | Ingolstadt, Alemanha | (Chen <i>et al.</i> , 2016) |

n - número de amostras; LD - limite de detecção; LQ - limite de quantificação; Rec - recuperação; Conc. - concentração; nd - não detectado; ni - não indicado

3 Descrição técnica

3.1 Reagentes

Os padrões sólidos usados nas experiências, tais como os *musks* sintéticos *cashmeran*, *celestolide*, *phantolide*, *galaxolide* e *tonalide* foram comprados na *LGC Standards* (Barcelona, Espanha) com uma pureza de 99%, exceto para a *galaxolide*, que contém aproximadamente 25% de dietilftalato (DEP). O *musk tibetene* e *musk moskene* provêm da mesma empresa como uma solução de 10 mg/L em ciclohexano. O *musk ambrette* e *musk ketone* foram obtidos da *Dr. Ehrenstorfer GmbH* (Augsburg, Alemanha) como padrões sólidos com uma pureza de 99% e 98%, respectivamente. O *musk xylene* foi adquirido na *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA) como uma solução de 100 mg/L em acetonitrilo. Também desta empresa foram provenientes o *exaltolide* e o *ethylene brassylate* com purezas $\geq 95\%$ e $\geq 99\%$, respectivamente. Da *Alfa Aesar* (Karlsruhe, Alemanha) proveio o padrão sólido do filtro-UV cânfora de 3-(4-metilbenzilideno) (4-MBC) com 99% de pureza e a solução de benzoato de 2-etil-hexil 4-dimetilamino (EDP) com 99% de pureza. O 4-metoxycinamato de 2-etil-hexilo (EMC) e 2-ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etil-hexilo (octocrileno) (OC) foram adquiridos na *Sigma-Aldrich* em soluções com purezas de 98% e 97%, respectivamente. Os padrões *musk xylene*-d₁₅ e *musk tonalide*-d₃ foram também adquiridos na *Dr. Ehrenstorfer GmbH* como soluções individuais de 100 mg/L em acetona e isoctano, respectivamente. O antraceno-d₁₀ foi adquirido à *Supelco* (Bellefonte, PA, EUA) em forma de pó com uma pureza de padrão analítico. O 4-MBC-d₄ foi comprado na empresa *CDN Isotopes* (Pointe-Claire, QC, Canadá) em estado sólido com uma pureza de 99%.

Os sais e sorbentes necessários para preparar os QuEChERS como o sulfato de magnésio e acetato de sódio foram adquiridos à *Merck Millipore* (Darmstadt, Alemanha) e o PSA e DSC-18 à *Supelco* (Bellefonte, PA, EUA). Os solventes orgânicos usados (acetonitrilo, *n*-hexano e diclorometano) foram adquiridos à empresa *VWR* (Fontenay-sous-Bois, França).

3.2 Preparação das soluções padrão

As soluções-mãe de cada um dos *musks* policíclicos foram preparadas a 13,3 g/L, dos *musks ambrette* e *ketone* a 6,7 g/L e dos *musks* macrocíclicos a 10 g/L em ciclohexano. A partir destas soluções foi preparado um padrão mix intermédio de 10 mg/L em acetonitrilo. Para se obter um padrão final (6 mg/L) contendo todos os *musks* a analisar, evaporou-se uma quantidade apropriada dos *musks tibetene* e *moskene* numa corrente de azoto, adicionou-se depois a quantidade necessária do padrão mix intermédio e do padrão comercial de *musk xylene*, perfazendo o restante volume com acetonitrilo. A mistura dos padrões internos de *musks* foi preparada de modo a obter uma concentração final de 10 mg/L em acetonitrilo, adicionando-se quantidades apropriadas dos padrões comerciais de *musk xylene*-d₁₅ e *musk tonalide*-d₃. As soluções-mãe individuais dos filtros-UV cânfora de 3-(4-metilbenzilideno) (4-MBC), benzoato de 2-etil-hexil 4-dimetilamino (EDP), 4-metoxycinamato de 2-etil-hexilo (EMC) e 2-ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etil-hexilo (octocrileno)

(OC) foram preparadas a 1,0 g/L em acetonitrilo. A solução padrão contendo a mistura destes filtros-UV foi preparada a 10 mg/L em acetonitrilo, a partir das soluções-mãe individuais. O padrão interno dos filtros-UV (4-MBC-d₄) foi preparado com uma concentração de 100 mg/L em acetonitrilo. O padrão de injeção de antraceno-d₁₀ foi primeiramente preparado numa solução de 100 mg/L em acetonitrilo, e para no fim, se obter uma solução final de 250 µg/L em acetonitrilo.

A partir das soluções padrão finais prepararam-se padrões mistos contendo as duas classes de compostos, com concentrações que variaram entre 10 e 1000 µg/L em acetonitrilo. A mistura dos padrões internos de *musks* e filtros-UV foi preparada a uma concentração de 500 µg/L em acetonitrilo. Todas as soluções foram armazenadas num congelador e preservadas a uma temperatura de -20 °C, protegidas da luz.

3.3 Amostragem

As amostras deste estudo foram recolhidas no litoral do Porto (Portugal), uma região com mais de 1 milhão de habitantes, em praias com cordões dunares ou com condições para o crescimento de plantas costeiras (Matosinhos e Vila Nova de Gaia). Foram recolhidas 42 amostras de 15 praias diferentes no fim do inverno (março de 2016). Foram recolhidas cinco espécies diferentes de plantas dunares: chorão (*Carpobrotus edulis*), feno-das-areias (*Elymus farctus boreali-atlanticus*), luzerna-das-praias (*Medicago marina*), morgandinha-das-praias (*Euphorbia paralias*) e eruca-marinha (*Cakile maritima*) (Tabela 3.1). O critério de escolha foi a facilidade com que se encontravam estas espécies nas praias do Porto, o tamanho da sua estrutura vegetal e a variação dos aspetos biológicos das plantas, nomeadamente, no que diz respeito à forma e constituição das folhas e caules e distribuição por diferentes zonas do sistema dunar. As recolhas foram efetuadas com luvas, tendo o cuidado de não as reutilizar, evitando contaminações entre diferentes locais e espécies.

Tabela 3.1 - Características das espécies vegetais recolhidas


| Espécie vegetal | Descrição |
|--|---|
| Chorão <i>Carpobrotus edulis</i>  | O chorão é uma planta perene (sobrevive mais de dois anos) originária da África do Sul e invasiva em Portugal Continental. Apresenta caules rastejantes podendo atingir 2 metros, com folhas carnudas e de secção triangular, curvadas para cima e com pontas agudas. As folhas podem ter um tom verde ou avermelhado. As flores germinam de março a abril podendo apresentar cor amarela, rosa ou roxa com diâmetros entre 8 e 10 cm (Delipetrou, 2006). Alastra-se a todas as zonas do sistema dunar com maior capacidade de sobrevivência na duna estabilizada. É usada na África subsariana como método de medicina tradicional no tratamento de sintomas de tuberculose, infeções de garganta, diarreia entre outras. Os compostos triterpenos com propriedades antimicrobiais mais eficazes constituintes do chorão são o uvaol, ácido oleanólico e β-amirina (Martins <i>et al.</i> , 2011). |

Tabela 3.1 - Características das espécies vegetais recolhidas (*continuação*)

| Espécie vegetal | Descrição |
|--|--|
| Feno-das-areias <i>Elymus farctus boreali-atlanticus</i>  | <p>Contém caules rígidos verticais podendo atingir 60 cm com folhas rígidas planas ou enroladas. É uma planta perene (sobrevive mais de dois anos) originária da costa atlântica típica da duna embrionária. A face superior das folhas é lisa e brilhante enquanto a inferior contém fendas longitudinais que aumentam a área útil para trocas gasosas. As flores desenvolvem-se numa espiga com o eixo frágil (Rodwell, 2000). Nestas plantas ocorrem com grande frequência quebras cromossômicas espontâneas, apresentando esta desequilíbrios genéticos para que tal aconteça (Heneen, 1963).</p> |
| Luzerna-das-praias <i>Medicago marina</i>  | <p>A luzerna-das-praias é uma planta perene (sobrevive mais de dois anos) com uma tonalidade esbranquiçada devido às suas folhas e caules serem cobertos por uma densa camada de pelos entrelaçados. Distribuem-se ao longo do litoral de Portugal Continental com predominância nas dunas secundárias. Contém um rizoma rastejante de onde surgem várias ramificações com parte lenhosa na base. As folhas são ovais e trifolioladas, inteiras ou dentadas. Possui flores amarelas em cachos de 5 a 12 flores, de abril a junho (Biorede, 2016). As sementes desta planta demonstram forte dormência que previne a germinação, devido ao ácido abscísico contido na sua estrutura (Petrollini, 2011).</p> |
| Morganheira-das-praias <i>Euphorbia paralias</i>  | <p>Planta perene (sobrevive mais de dois anos) originária da região mediterrânica e costa atlântica da Europa com 1 a 10 caules, 30-35 cm de comprimento acima da areia, levando a uma longa raiz principal. Tem folhas estreitas sobrepostas ao longo dos caules de cor amarelo-esverdeado, com presença de flores na primavera e verão. Surge na duna embrionária e apresenta uma seiva branca, quando o seu caule é quebrado, com propriedades irritantes e citotóxicas (Scott, 2010). Os compostos biologicamente ativos nestas plantas são ésteres diterpenos. Da mistura que se obtém esmagando uma amostra desta planta, os compostos que se revelam responsáveis pelos efeitos irritantes e citotóxicos são o 3-angelil-20-deoxingeno, 3-hexanoil-20-deoxingeno e 3-angelilingeno (Sayed <i>et al.</i>, 1980).</p> |
| Eruca-marinha <i>Cakile maritima</i>  | <p>Planta anual de 7 a 40 cm de altura ramificada desde a base e carnuda presente no litoral de Portugal, principalmente na praia alta. As folhas são sinuadas ou lobuladas e as flores violáceas, rosadas ou brancas, presentes de março a dezembro. Vive em areias marítimas nitrificadas, que sofreram galgamentos recentes, sendo boas acumuladoras de areia (Haubensak & Smyth, 1996). Apresenta grande tolerância à salinidade devido à presença de polifenol na sua estrutura. As suas folhas contêm propriedades antioxidantes devido ao seu constituinte 1,1-difenil-2-picril-hidrazil e à eliminação de superóxido que ocorre na sua estrutura (Ksouri <i>et al.</i>, 2007).</p> |

A Figura 3.1 mostra a localização das 15 praias ao longo da costa litoral de Portugal. As coordenadas geográficas, data de amostragem, distância a ETARs, espécies recolhidas e número de utilizadores nas épocas balneares encontram-se na Tabela 3.2. A distância a ETARs foi determinada pelos mapas disponibilizados, considerando para as praias de Matosinhos a distância em linha reta desde a ETAR de Leça da Palmeira até à praia e para as praias de Gaia desde a ETAR de Gaia Litoral.



Figura 3.1 - Localização no Grande Porto das praias onde decorreram amostragens.

Tabela 3.2 - Características dos locais de amostragem

| | Local | Latitude | Longitude | Data (2016) | T (°C) | Ch | Fe | Lu | Mo | Er | Distância a ETAR (km) | N.º utilizadores na época balnear ^a |
|-------------------|-----------------|---------------|---------------|----------------|----------|----|----|----|----|----|-----------------------|--|
| Matosinhos | Angeiras Norte | 41° 16' 7" N | -8° 43' 34" O | 12-03 | 15 | x | | x | x | | 6,4 | si |
| | Funtão | 41° 15' 29" N | -8° 43' 24" O | 12-03 | 15 | x | | x | | | 5,3 | 150 |
| | Pedras do Corgo | 41° 15' 1" N | -8° 43' 24" O | 12-03 | 15 | x | | | | | 4,7 | si |
| | Agudela | 41° 14' 31" N | -8° 43' 34" O | 12-03 | 15 | x | | x | x | | 3,9 | 800 |
| | Memória | 41° 13' 54" N | -8° 43' 16" O | 12-03 | 15 | x | | x | | | 2,6 | 500 |
| | Paraíso | 41° 13' 25" N | -8° 42' 58" O | 12-03 | 15 | x | | x | | | 1,5 | si |
| | Salinas | 41° 13' 5" N | -8° 42' 52" O | 12-03 | 15 | x | x | x | x | | 0,7 | si |
| Vila Nova de Gaia | Estrela do Mar | 41° 7' 22" N | -8° 40' 1" O | 13-03 | 15 | x | | x | | | 2,0 | si |
| | Canide Norte | 41° 6' 42" N | -8° 39' 46" O | 04-03 | 13 | x | x | x | x | x | 1,0 | 311250 |
| | Canide Sul | 41° 6' 35" N | -8° 39' 48" O | 04-03 13-03 | 13 15 | x | x | x | x | x | 0,6 | si |
| | Madalena Norte | 41° 6' 6" N | -8° 39' 39" O | 13-03 | 15 | x | x | x | x | | 1,3 | 345000 |
| | Valadares Norte | 41° 5' 36" N | -8° 39' 28" O | 13-03 | 15 | x | | x | | | 2,2 | si |
| | Dunas Mar | 41° 4' 57" N | -8° 39' 23" O | 13-03 | 15 | x | | x | | | 3,4 | si |
| | Sãozinha | 41° 4' 21" N | -8° 39' 25" O | 13-03 | 15 | x | | x | x | | 4,7 | 345000 |
| | Areia Branca | 41° 3' 13" N | -8° 39' 17" O | 13-03 | 15 | x | | x | | | 6,5 | si |

^aAssociação Bandeira Azul da Europa (2009); x - amostra recolhida no local; Ch - chorão; Fe - feno; Lu - luzerna; Mo - morganheira; Er - eruca; si - sem informação

3.4 Extração e *clean-up*

O método de extração e *clean-up* utilizado neste estudo foi o de QuEChERS, com a implementação de alterações, como demonstra a Figura 3.2. O método consistiu na pesagem de 2,5 g de amostra para um tubo *Falcon* adicionando-lhe depois 10 mL de solvente. O tubo foi levado a

um banho de ultrassons de 420 W (*J.P. Selecta*, Barcelona, Espanha) durante 15 min. Os sais dos primeiros QuEChERS (6 g de MgSO_4 e 1,5 g de NaCH_3COO) foram adicionados ao tubo inicial, com consequente agitação durante 2 min no *vortex* e 10 min a $2670 \times g$ na centrífuga (*Hettich® Rotofix 32A*, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA). O sal, sulfato de magnésio (MgSO_4), foi usado como agente exsicante, facilitando a partição de analitos polares para o solvente orgânico. O acetato de sódio (NaCH_3COO), teve como função aumentar a polaridade da fase aquosa e manter o valor de pH. O sobrenadante resultante da centrifugação foi depois transferido para o segundo QuEChERS (900 mg MgSO_4 , 300 mg PSA e 150 mg DSC-18), sendo novamente agitado no *vortex* durante 2 min e centrifugado durante 10 min a $2670 \times g$. O sulfato de magnésio foi usado para remover a água remanescente, o PSA interfere com polares como ácidos orgânicos polares, pigmentos polares, alguns açúcares e ácidos gordos e o C_{18} para remover substâncias interferentes apolares como lípidos. O sobrenadante desta etapa foi filtrado (filtro de PTFE 0,20 μm) para um *vial* cônico de 15 mL de vidro âmbar, para depois sofrer secagem em fluxo de N_2 até atingir um volume de aproximadamente 500 μL . O seu conteúdo foi transferido para um *vial* de 1,5 mL de vidro âmbar, com lavagens de solvente, voltando a sofrer secagem em corrente de N_2 até à total evaporação. Por último, o extrato seco foi reconstituído com 150 μL de solução de antraceno- d_{10} em acetonitrilo e transferido para um *vial* de 1,5 mL de vidro âmbar com *insert* antes da análise em GC-MS.



Figura 3.2 - Procedimento de QuEChERS utilizado neste estudo.

3.5 Instrumentação

A análise dos *musks* e filtros-UV foi efetuada usando um sistema *Varian Ion Trap* GC-MS (Walnut Creek, CA, EUA), equipado com um cromatógrafo gasoso 450-GC, um espectrómetro de massa de *ion trap* 240-MS, um injetor *split/splitless* CP-1177, um *waveboard* para múltiplas análises em MS (MS^n) e um *autosampler* modelo CP-8410. O espectrómetro de massa operou no modo de ionização eletrônica (EI) a 70 eV e o sistema foi controlado pelo *software Varian MS workstation* versão 6.9.3. A separação foi executada com um fluxo constante de 1,0 mL/min de hélio com uma pureza de 99,999% numa coluna capilar *Varian* CP-Sil 8 CB (50 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,12 μm de espessura). A temperatura do forno teve a seguinte programação: 100 °C durante 1 min, aumentou-se a 6 °C/min para 150 °C (permanecendo durante 4 min), depois

a 3 °C/min para 180 °C (conservando-se por 5 min) e por fim elevou-se a 15 °C/min para 300 °C (mantendo este valor por 2,5 min), com um tempo total de corrida de 38,83 min. A injeção foi executada em modo *splitless*, com a válvula de *split* fechada por 5 min. A temperatura no injetor, linha de transferência e *ion trap* foi mantida a 250 °C nestes locais e a 50 °C no *manifold*. A corrente de emissão do filamento foi de 50 µA. Para a análise quantitativa dos compostos-alvo foi aplicado o armazenamento dos iões selecionados (SIS). A Tabela 3.3 apresenta os tempos de retenção e os iões quantificadores e qualificadores usados para a deteção SIS.

Tabela 3.3 - Iões quantificadores e qualificadores e tempos de retenção de cada composto analisado no GC-MS

| Composto | Tempo de retenção (min) | Iões quantificadores (m/z) | Iões qualificadores (m/z) |
|------------------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <i>Cashmeran</i> | 13,585 | 191 | 135, 163, 206 |
| <i>Celestolide</i> | 20,808 | 229 | 173, 244 |
| <i>Phantolide</i> | 22,260 | 229 | 187 |
| <i>Exaltolide</i> | 24,618 | 69, 95 | 67, 81 |
| <i>Musk ambrette</i> | 24,819 | 253 | 91, 77 |
| <i>Galaxolide</i> | 25,458 | 243 | 131, 213 |
| <i>Musk xylene</i> | 25,862 | 282 | 115, 128 |
| <i>Tonalide</i> | 26,046 | 243 | 159 |
| <i>Musk moskene</i> | 26,900 | 263 | 115, 128 |
| <i>Musk tibetene</i> | 29,028 | 251 | 115, 128 |
| <i>Musk ketone</i> | 30,405 | 279 | 128, 160 |
| <i>Ethylene Brassylate</i> | 31,071 | 227, 125 | 83, 98 |
| 4-MBC | 31,929 | 254 | 128, 169, 211 |
| EDP | 34,679 | 165 | 148 |
| EMC | 35,113 | 178 | 161 |
| OC | 37,605 | 360 | 204, 232, 248 |
| <i>Musk xylene-d₁₅</i> | 25,344 | 294 | 122, 154 |
| <i>Musk tonalide-d₃</i> | 25,943 | 246 | 160 |
| 4-MBC-d ₄ | 31,833 | 258 | 132, 159, 215 |
| Antraceno-d ₁₀ | 23,011 | 188 | 160 |

3.6 Controlo da qualidade

De modo a não haver qualquer contaminação dos extratos, todos os frequentadores do laboratório tiveram o cuidado de não utilizar produtos com *musks* e filtros-UV. No laboratório o uso de bata e luvas é obrigatório. Todo o material usado é lavado com água, acetona pura e água destilada sendo levado posteriormente à estufa ou à mufla, caso seja material de vidro não rigoroso. Brancos laboratoriais foram executados em todos os *batch* de extrações.

3.7 Gestão de resíduos

Os resíduos gerados no trabalho laboratorial consistiram em resíduos líquidos e sólidos. Os resíduos líquidos consistindo fundamentalmente em misturas com acetonitrilo, acetona, *n*-hexano e diclorometano, foram armazenados em recipientes fechados de vidro devidamente rotulados. Os resíduos sólidos consistiram em pedaços de plantas contaminados e partículas dos vários sorbentes usados, sendo também recolhidos num frasco de plástico devidamente rotulado. Todos estes resíduos foram encaminhados para o sistema de gestão ambiental da FEUP (EcoFEUP).

4 Resultados e discussão

4.1 Estudo preliminar do efeito do solvente no método de extração

No método de extração, o solvente orgânico tem um papel fulcral para a extração dos compostos que se pretendem analisar. Assim, neste trabalho fez-se um estudo preliminar do efeito do solvente no método de extração escolhido. Optou-se por testar a extração com acetonitrilo (o solvente mais comum em QuEChERS) e com uma mistura de Hex/DCM (1:1), tendo em conta a polaridade dos compostos-alvo. Foram efetuados testes de recuperação (15 ng/g) para cada espécie vegetal a analisar (Figura 4.1).

Analisando esta figura pode-se concluir que os dois solventes originaram percentagens de recuperação semelhantes para a maioria dos compostos e espécies vegetais testadas. No entanto, para alguns casos particulares verificou-se um maior efeito matriz nos testes efetuados com acetonitrilo (como por exemplo, na extração de *musk ambrette*, *ethylene brassylate* e EDP da morganheira, EDP e EMC na luzerna e *musk ambrette* e *tibetene* no feno). Este efeito matriz que foi verificado principalmente nestas três plantas, deverá estar relacionado com a extração de compostos interferentes, que influenciam o método instrumental. Para além disso, o tempo requerido para a secagem de extratos em corrente de azoto com acetonitrilo ronda as 3 horas, podendo conduzir a eventuais perdas de alguns compostos durante este longo processo de evaporação. Por estas razões, optou-se por usar como solvente de extração uma mistura de Hex/DCM (1:1), pois para além de se obterem recuperações na maioria dos casos entre 80% e 100%, o tempo de secagem na corrente de azoto é apenas de 30 min.

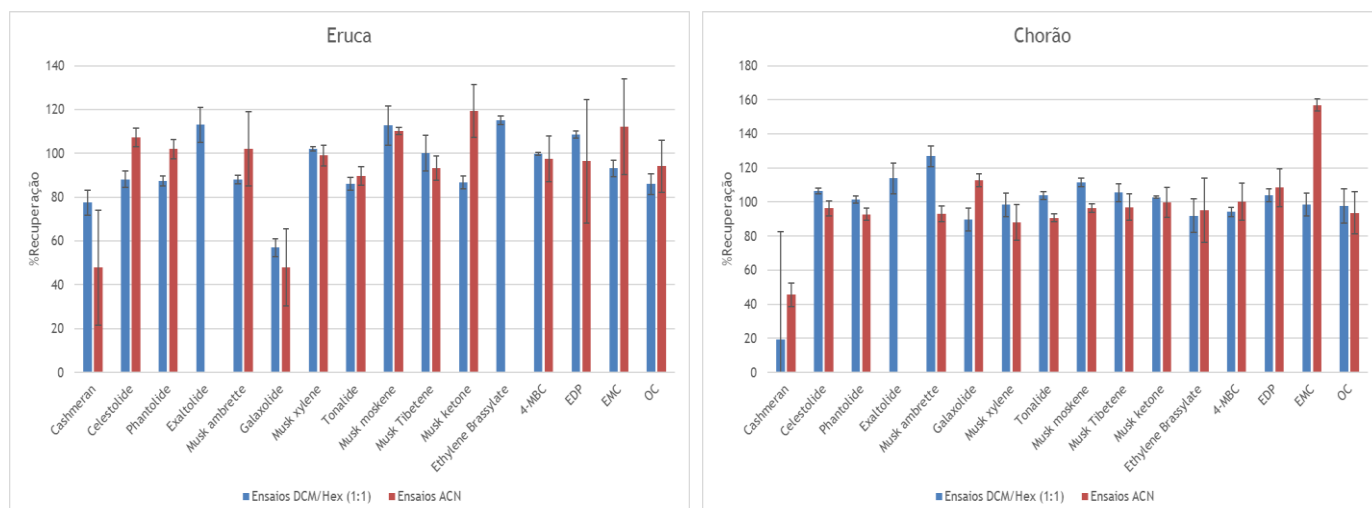


Figura 4.1 - Resultado dos testes de recuperação para os solventes DCM/Hex (1:1) e ACN nas diferentes espécies vegetais.

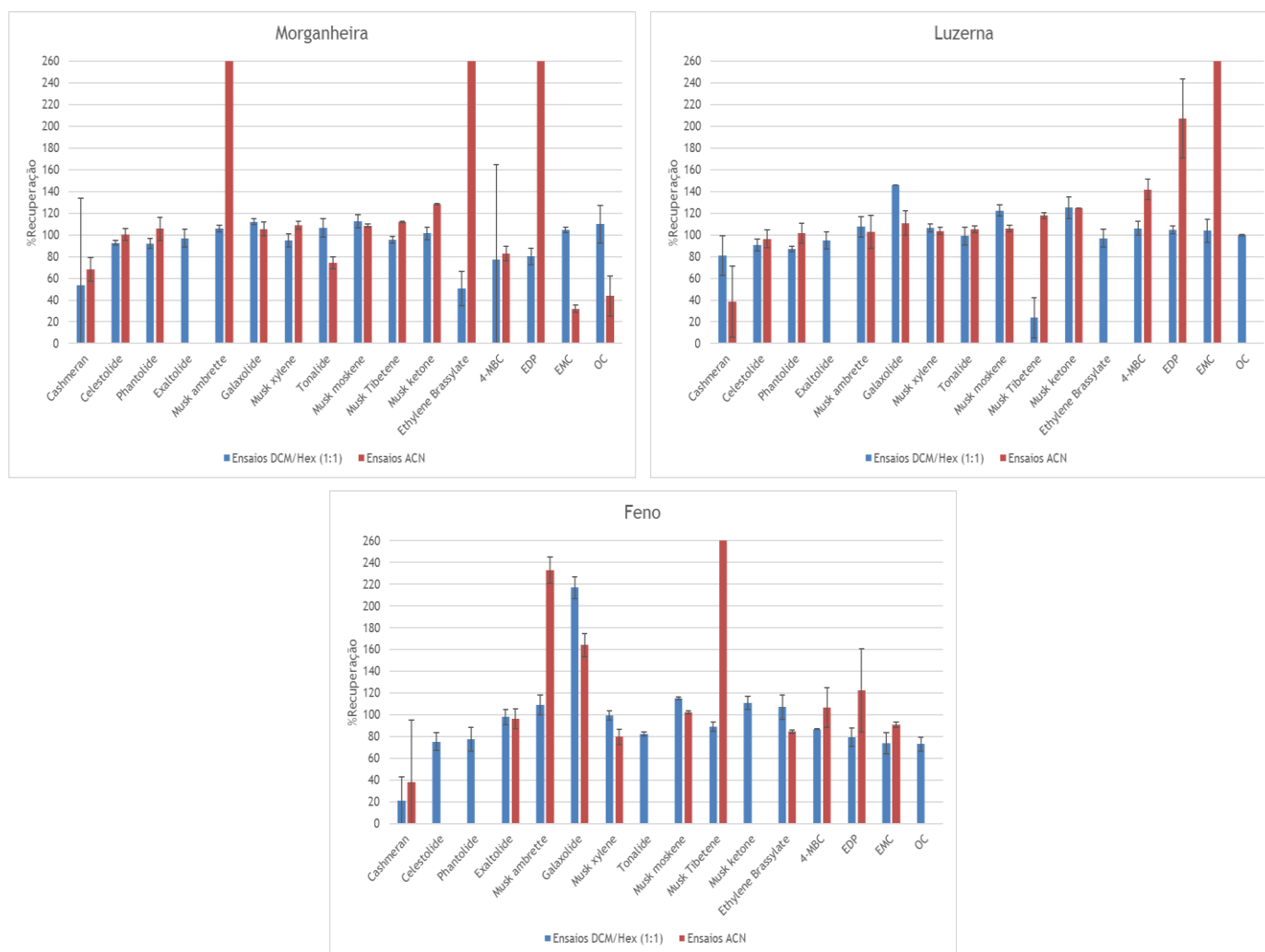


Figura 4.1 - Resultado dos testes de recuperação para os solventes DCM/Hex (1:1) e ACN nas diferentes espécies vegetais. (continuação)

4.2 Validação do método analítico

A avaliação da qualidade do método analítico foi realizada analisando diversos parâmetros, com o método do padrão interno a ser implementado para quantificar os *musks* e filtros-UV. As curvas de calibração (Anexo 3) foram obtidas pela injeção de 7 soluções padrão de calibração contendo todos os compostos a diferentes níveis de concentração (10, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/L). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados considerando uma razão sinal/ruído de 3 e 10, respetivamente. A Tabela 4.1 apresenta as gamas de linearidade, os valores obtidos da sensibilidade do método, coeficiente de correlação (r^2), limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada composto analisado.

Tabela 4.1 - Parâmetros de linearidade para a determinação de musks e filtros-UV

| Compostos | Gama de linearidade (µg/L) | Sensibilidade (L/µg) | r ² | LD (µg/L) | LQ (µg/L) | LD (ng/g) | LQ (ng/g) |
|----------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Cashmeran</i> | 10-1000 | $1,72 \times 10^{-3}$ | 1,000 | 6,20 | 20,7 | 0,37 | 1,24 |
| <i>Celestolide</i> | 10-1000 | $4,65 \times 10^{-3}$ | 1,000 | 0,27 | 0,90 | 0,02 | 0,05 |
| <i>Phantolide</i> | 10-1000 | $3,51 \times 10^{-3}$ | 1,000 | 0,56 | 1,85 | 0,03 | 0,11 |
| <i>Exaltolide</i> | 10-1000 | $1,09 \times 10^{-3}$ | 1,000 | 5,26 | 17,5 | 0,32 | 1,05 |
| <i>Musk ambrette</i> | 100-1000 | $2,85 \times 10^{-3}$ | 1,000 | 22,1 | 73,5 | 1,32 | 4,41 |
| <i>Galaxolide</i> | 10-1000 | $1,80 \times 10^{-3}$ | 1,000 | 3,33 | 11,1 | 0,20 | 0,67 |
| <i>Musk xylene</i> | 10-1000 | $1,68 \times 10^{-3}$ | 1,000 | 1,88 | 6,27 | 0,11 | 0,38 |
| <i>Tonalide</i> | 10-1000 | $1,96 \times 10^{-3}$ | 0,999 | 0,34 | 1,14 | 0,02 | 0,07 |
| <i>Musk moskene</i> | 10-1000 | $2,70 \times 10^{-3}$ | 0,999 | 7,50 | 25,0 | 0,45 | 1,50 |
| <i>Musk tibetene</i> | 50-1000 | $4,39 \times 10^{-3}$ | 1,000 | 11,5 | 38,5 | 0,69 | 2,31 |
| <i>Musk ketone</i> | 50-1000 | $3,81 \times 10^{-3}$ | 0,998 | 1,76 | 5,85 | 0,11 | 0,35 |
| <i>Ethylene Brassylate</i> | 10-1000 | $1,17 \times 10^{-3}$ | 1,000 | 0,05 | 0,17 | 0,003 | 0,01 |
| 4-MBC | 10-1000 | $2,19 \times 10^{-3}$ | 1,000 | 1,15 | 3,85 | 0,07 | 0,23 |
| EDP | 10-1000 | $6,10 \times 10^{-3}$ | 0,999 | 0,64 | 2,13 | 0,04 | 0,13 |
| EMC | 10-1000 | $7,13 \times 10^{-3}$ | 1,000 | 3,33 | 11,1 | 0,20 | 0,67 |
| OC | 10-1000 | $2,88 \times 10^{-3}$ | 1,000 | 2,14 | 7,14 | 0,13 | 0,43 |

Pela análise da tabela e Anexo 3, percebe-se que todas as retas de calibração dos compostos analisados apresentam um comportamento linear. A concentração foi correlacionada com o fator de resposta (fator de resposta = área do composto/área do padrão interno), onde o *musk xylene*-d₁₅ foi usado como padrão interno para os *nitromusks*, o *musk tonalide*-d₃ para os musks policíclicos e macrocíclicos e o 4-MBC-d₄ usado como padrão interno dos filtros-UV. Todas as curvas de calibração apresentaram um desvio-padrão relativo do declive (s_a/a) abaixo dos 5% e um coeficiente de correlação (r) superior a 0,995. Contudo, para a maioria das curvas de calibração a ordenada na origem não contém a origem ($b-s_b < 0 < b+s_b$), sendo exceção a este facto as curvas de calibração dos compostos *cashmeran*, *galaxolide* e 4-MBC.

Os limites de deteção (LD) dos musks variaram entre 0,003 ng/g (*ethylene brassylate*) e 1,32 ng/g (*musk ambrette*) e dos filtros-UV entre 0,04 ng/g (EDP) e 0,20 ng/g (EMC). Comparando os valores do LD com os presentes na literatura, verifica-se que na maioria dos casos os valores encontrados neste estudo são da mesma ordem de grandeza. É importante relembrar que não se encontraram estudos na literatura que estudassem vegetação dunar.

A precisão do método utilizado foi avaliada através da repetibilidade, expressa através do coeficiente de variação (%CV) de três extrações independentes efetuadas no mesmo dia, a três níveis de concentração diferentes (15, 30 e 45 ng/g). A exatidão foi avaliada para os mesmos níveis de concentração através de testes de recuperação (%Rec). Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Resultados referentes a estudos de precisão e exatidão do método analítico utilizado

| Eruca-marinha | | | | | | |
|------------------------|----------------|---------|---------|-----------------|---------|---------|
| Compostos | Precisão (%CV) | | | Exatidão (%Rec) | | |
| | 15 ng/g | 30 ng/g | 45 ng/g | 15 ng/g | 30 ng/g | 45 ng/g |
| Cashmeran | 6 | 4 | 9 | 78 | 44 | 64 |
| Celestolide | 4 | 1 | 1 | 88 | 55 | 75 |
| Phantolide | 2 | 2 | 3 | 87 | 57 | 76 |
| Exaltolide | 8 | 7 | 3 | 113 | 86 | 64 |
| Musk ambrette | 2 | 11 | 22 | 88 | 101 | 172 |
| Galaxolide | 4 | 15 | 9 | 57 | 62 | 87 |
| Musk xylene | 1 | 10 | 4 | 102 | 119 | 93 |
| Tonalide | 3 | 5 | 2 | 86 | 77 | 78 |
| Musk moskene | 9 | 10 | 4 | 113 | 113 | 91 |
| Musk tibetene | 8 | 9 | 2 | 100 | 109 | 92 |
| Musk ketone | 3 | 9 | 6 | 87 | 115 | 111 |
| Ethylene Brassylate | 2 | 5 | 7 | 115 | 101 | 102 |
| 4-MBC | 1 | 4 | 5 | 100 | 93 | 85 |
| EDP | 2 | 10 | 2 | 108 | 96 | 86 |
| EMC | 4 | 2 | 4 | 93 | 96 | 101 |
| OC | 5 | 7 | 5 | 86 | 92 | 95 |
| Chorão | | | | | | |
| Compostos | Precisão (%CV) | | | Exatidão (%Rec) | | |
| | 15 ng/g | 30 ng/g | 45 ng/g | 15 ng/g | 30 ng/g | 45 ng/g |
| Cashmeran | 63 | 12 | 3 | 20 | 44 | 48 |
| Celestolide | 2 | 6 | 1 | 106 | 57 | 72 |
| Phantolide | 2 | 5 | 5 | 102 | 65 | 71 |
| Exaltolide | 9 | 8 | 3 | 114 | 102 | 61 |
| Musk ambrette | 6 | 7 | 7 | 127 | 98 | 92 |
| Galaxolide | 7 | 10 | 6 | 90 | 109 | 115 |
| Musk xylene | 7 | 8 | 5 | 98 | 116 | 98 |
| Tonalide | 2 | 3 | 6 | 104 | 70 | 76 |
| Musk moskene | 2 | 8 | 3 | 111 | 116 | 97 |
| Musk tibetene | 5 | 10 | 6 | 106 | 94 | 104 |
| Musk ketone | 1 | 6 | 9 | 103 | 117 | 130 |
| Ethylene Brassylate | 10 | 4 | 1 | 92 | 99 | 97 |
| 4-MBC | 3 | 10 | 2 | 94 | 103 | 77 |
| EDP | 4 | 3 | 5 | 104 | 153 | 87 |
| EMC | 7 | 1 | 6 | 99 | 157 | 98 |
| OC | 10 | 1 | 8 | 98 | 116 | 95 |
| Morganheira-das-praias | | | | | | |
| Compostos | Precisão (%CV) | | | Exatidão (%Rec) | | |
| | 15 ng/g | 30 ng/g | 45 ng/g | 15 ng/g | 30 ng/g | 45 ng/g |
| Cashmeran | 80 | 8 | 9 | 54 | 51 | 98 |
| Celestolide | 2 | 5 | 2 | 93 | 58 | 78 |
| Phantolide | 5 | 9 | 5 | 92 | 65 | 82 |
| Exaltolide | 8 | 9 | 0 | 97 | 95 | 90 |
| Musk ambrette | 3 | 21 | 14 | 106 | 141 | 113 |
| Galaxolide | 3 | 1 | 9 | 112 | 86 | 105 |
| Musk xylene | 6 | 10 | 2 | 95 | 114 | 94 |
| Tonalide | 9 | 4 | 1 | 107 | 64 | 81 |
| Musk moskene | 6 | 9 | 5 | 113 | 120 | 103 |
| Musk tibetene | 3 | 2 | 8 | 96 | 93 | 81 |
| Musk ketone | 6 | 6 | 7 | 101 | 115 | 112 |
| Ethylene Brassylate | 16 | 10 | 6 | 51 | 87 | 79 |
| 4-MBC | 87 | 5 | 7 | 78 | 99 | 66 |
| EDP | 8 | 3 | 0 | 80 | 101 | 120 |
| EMC | 2 | 4 | 9 | 105 | 160 | 171 |
| OC | 17 | 11 | 6 | 110 | 104 | 108 |

Tabela 4.2 - Resultados referentes a estudos de precisão e exatidão do método analítico utilizado (*continuação*)

| Luzerna-das-praias | | | | | | |
|----------------------------|----------------|---------|---------|-----------------|---------|---------|
| Compostos | Precisão (%CV) | | | Exatidão (%Rec) | | |
| | 15 ng/g | 30 ng/g | 45 ng/g | 15 ng/g | 30 ng/g | 45 ng/g |
| <i>Cashmeran</i> | 18 | 3 | 5 | 81 | 47 | 101 |
| <i>Celestolide</i> | 5 | 3 | 4 | 91 | 61 | 80 |
| <i>Phantolide</i> | 3 | 4 | 3 | 87 | 62 | 85 |
| <i>Exaltolide</i> | 8 | 3 | 8 | 95 | 93 | 75 |
| <i>Musk ambrette</i> | 10 | 7 | 4 | 107 | 100 | 101 |
| <i>Galaxolide</i> | 0 | 45 | 8 | 146 | 57 | 79 |
| <i>Musk xylene</i> | 4 | 7 | 4 | 106 | 122 | 89 |
| <i>Tonalide</i> | 8 | 3 | 3 | 99 | 75 | 99 |
| <i>Musk moskene</i> | 5 | 9 | 1 | 122 | 113 | 87 |
| <i>Musk tibetene</i> | 19 | 4 | 0 | 24 | 122 | 84 |
| <i>Musk ketone</i> | 10 | 9 | 6 | 125 | 100 | 111 |
| <i>Ethylene Brassylate</i> | 8 | 31 | 0 | 97 | 113 | 103 |
| 4-MBC | 7 | 6 | 7 | 106 | 97 | 72 |
| EDP | 4 | 9 | 5 | 105 | 85 | 62 |
| EMC | 11 | 7 | 4 | 104 | 87 | 68 |
| OC | 1 | 4 | 3 | 100 | 69 | 67 |
| Feno-das-areias | | | | | | |
| Compostos | Precisão (%CV) | | | Exatidão (%Rec) | | |
| | 15 ng/g | 30 ng/g | 45 ng/g | 15 ng/g | 30 ng/g | 45 ng/g |
| <i>Cashmeran</i> | 22 | 4 | 9 | 21 | 44 | 89 |
| <i>Celestolide</i> | 8 | 1 | 2 | 75 | 55 | 74 |
| <i>Phantolide</i> | 11 | 2 | 6 | 77 | 57 | 74 |
| <i>Exaltolide</i> | 7 | 7 | 4 | 98 | 86 | 126 |
| <i>Musk ambrette</i> | 9 | 11 | 8 | 109 | 101 | 106 |
| <i>Galaxolide</i> | 10 | 15 | 10 | 217 | 62 | 97 |
| <i>Musk xylene</i> | 4 | 10 | 9 | 99 | 119 | 106 |
| <i>Tonalide</i> | 2 | 5 | 1 | 82 | 77 | 81 |
| <i>Musk moskene</i> | 1 | 10 | 8 | 115 | 113 | 100 |
| <i>Musk tibetene</i> | 4 | 9 | 2 | 89 | 109 | 98 |
| <i>Musk ketone</i> | 6 | 9 | 8 | 111 | 115 | 126 |
| <i>Ethylene Brassylate</i> | 11 | 5 | 7 | 107 | 101 | 89 |
| 4-MBC | 0 | 4 | 2 | 87 | 93 | 55 |
| EDP | 8 | 10 | 5 | 80 | 96 | 45 |
| EMC | 10 | 2 | 10 | 74 | 96 | 62 |
| OC | 7 | 7 | 9 | 73 | 92 | 53 |

Analisando os coeficientes de variação obtidos nos ensaios de repetibilidade, pode-se verificar que a maioria das ocorrências se situa abaixo de 15%, demonstrando uma precisão satisfatória do método empregue. Valores de coeficiente de variação muito superiores a 15% foram encontrados, de um modo geral, para o *cashmeran* no nível de *spike* mais baixo, nomeadamente no chorão e na morganheira-das-praias. Este facto poderá estar relacionado com a maior volatilidade deste composto, comparado com a dos restantes. Com o aumento da concentração de *spike* era previsível que os valores dos coeficientes de variação diminuíssem, o que geralmente foi verificado.

As percentagens de recuperação média obtidas para cada espécie vegetal rondaram os 93%. Os valores mais baixos de recuperação foram, em geral, verificados para os compostos mais voláteis como o *cashmeran*. Valores atipicamente elevados, indicando um efeito de matriz preponderante, foram encontrados para alguns filtros-UV (EMC e EDP) na morganheira-das-praias e no chorão. Comparando com a literatura, estes valores de recuperação encontram-se dentro da gama de valores presentes em Silva *et al.* (2015), para todos os compostos analisados, sendo que para o *cashmeran* as recuperações revelam-se mais elevadas do que nesta publicação sobre deteção de *musks* sintéticos nas agulhas de pinheiro.

No Anexo 4 estão presentes vários cromatogramas em modo SIS, referentes a um padrão de calibração (750 µg/L), amostras de todas as espécies vegetais sem *spike* e com *spike* (45 ng/g). É

possível verificar que os compostos podem ser claramente identificados nesses cromatogramas e que nas amostras com *spike* não é verificado um efeito de matriz pronunciado.

4.3 Teor em água e teor lipídico das espécies vegetais

De modo a se conhecer melhor as plantas analisadas é importante a determinação do teor em água e em lípidos. O teor em água foi determinado colocando-se aproximadamente 2,5 g de cada amostra na estufa a 80 °C até se obter um peso constante. O teor lipídico foi obtido através da extração das amostras secas com hexano/acetona (1:1) num banho de ultrassons durante dois períodos de 30 min. Na Tabela 4.3 estão apresentados os resultados referentes a estes teores para cada planta estudada.

Tabela 4.3 - Valores dos teores de água e de lípidos das cinco plantas recolhidas (%)

| Espécies vegetais | Teor em água | Teor lipídico |
|------------------------|--------------|---------------|
| Eruca-marinha | 88,6 | 2,7 |
| Chorão | 91,4 | 3,1 |
| Morganheira-das-praias | 73,5 | 4,5 |
| Luzerna-das-praias | 72,0 | 3,3 |
| Feno-das-areias | 80,6 | 3,3 |

Como é demonstrado pela tabela, o chorão é a planta com maior teor em água (cerca de 90%), enquanto a luzerna-das-praias apresenta o valor mais baixo. Quanto ao teor lipídico, a espécie com maior destaque é a morganheira-das-praias, apresentando um teor superior a 4,5%, podendo dever-se à presença da seiva que a constitui. As outras plantas dunares apresentam teores lipídicos próximos de 3%.

4.4 *Musks* sintéticos nas espécies vegetais da orla costeira

Ultrapassada a fase de validação do método analítico, este foi aplicado a um total de 42 amostras de plantas dunares, como já descrito anteriormente. Analisando a presença dos *musks* nas amostras utilizadas, verifica-se que estes compostos foram detetados em todas as amostras recolhidas. Os valores das concentrações dos *musks* sintéticos que foram detetados nas amostras estão presentes na Tabela 4.4 (determinados em base seca). Como se pode verificar o *musk* policíclico *galaxolide* foi o único encontrado em todas as amostras recolhidas em concentrações entre 0,12 e 221 ng/g dw. O *musk* policíclico *cashmeran* só não foi encontrado na amostra de chorão da praia de Areia Branca, apresentando-se com grande frequência em todas as espécies analisadas, assim como o *nitromusk musk ketone* e o *musk* macrocíclico *ethylene brassylate*. Os policíclicos *phantolide* e *tonalide* e o *nitromusk musk xylene* apenas não foram detetados na espécie vegetal eruca-marinha. Os *nitromusks musk ambrette*, *moskene* e *tibetene* não foram detetados em nenhuma amostra, o que pode ser explicado pelo seu uso em produtos cosméticos estar proibido na UE. A concentração mais elevada detetada foi de *ethylene brassylate* (336 ng/g dw) na amostra de chorão da praia de Canide Norte.

Tabela 4.4 - Concentrações dos *musks* sintéticos nas amostras de plantas recolhidas (ng/g em peso seco)

| Eruca-marinha | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|------|------|------|-----|----|------|------|------|----|----|------|------|------|
| | DPMI | ADBI | AHMI | EXA | MA | HHCB | MX | AHTN | MM | MT | MK | EB | Σ |
| Canide Norte | 31,9 | nd | nd | nd | nd | 221 | nd | nd | nd | nd | 56,7 | 79,2 | 389 |
| Canide Sul | 75,9 | nd | nd | nd | nd | 40,1 | nd | nd | nd | nd | nd | 21,7 | 138 |
| Chorão | | | | | | | | | | | | | |
| | DPMI | ADBI | AHMI | EXA | MA | HHCB | MX | AHTN | MM | MT | MK | EB | Σ |
| Angeiras Norte | 22,8 | 2,14 | 8,55 | 180 | nd | 21,9 | nd | nd | nd | nd | 155 | 189 | 579 |
| Funtão | 40,4 | nd | 8,74 | nd | nd | 21,6 | nd | 6,18 | nd | nd | 201 | 197 | 475 |
| Pedras do Corgo | 33,2 | nd | nd | nd | nd | 8,73 | nd | 6,42 | nd | nd | nd | 241 | 290 |
| Agudela | 53,3 | nd | 6,70 | nd | nd | 3,29 | nd | 4,74 | nd | nd | 97,6 | 206 | 371 |
| Memória | 58,7 | nd | 7,72 | nd | nd | 37,3 | 10,8 | 2,61 | nd | nd | 169 | 128 | 414 |
| Paraíso | 122 | nd | 4,89 | nd | nd | 54,7 | 15,7 | 6,87 | nd | nd | 159 | 42,4 | 406 |
| Salinas | 86,7 | nd | nd | nd | nd | 56,0 | 15,4 | 16,9 | nd | nd | 130 | 39,7 | 345 |
| Estrela do Mar | 33,4 | nd | 4,71 | nd | nd | 41,6 | nd | nd | nd | nd | 40,1 | 259 | 379 |
| Canide Norte | 103 | nd | nd | nd | nd | 66,2 | nd | nd | nd | nd | nd | 336 | 505 |
| Canide Sul | 70,7 | nd | 5,22 | nd | nd | 142 | nd | nd | nd | nd | 58,5 | 251 | 528 |
| Madalena Norte | 169 | nd | nd | nd | nd | 7,12 | nd | nd | nd | nd | 26,9 | 14,5 | 217 |
| Valadares Norte | 41,2 | nd | 2,98 | nd | nd | 87,6 | nd | nd | nd | nd | 48,0 | 122 | 302 |
| Dunas Mar | 96,9 | nd | 3,18 | nd | nd | 21,5 | nd | nd | nd | nd | 44,6 | 145 | 311 |
| Sãozinha | 106 | nd | 4,90 | nd | nd | 55,7 | nd | 3,35 | nd | nd | 39,2 | 302 | 511 |
| Areia Branca | nd | nd | 4,22 | nd | nd | 51,1 | nd | nd | nd | nd | nd | 82,8 | 138 |
| Morganheira-das-praias | | | | | | | | | | | | | |
| | DPMI | ADBI | AHMI | EXA | MA | HHCB | MX | AHTN | MM | MT | MK | EB | Σ |
| Angeiras Norte | 7,12 | nd | 3,38 | nd | nd | 18,3 | nd | 2,39 | nd | nd | 72,3 | 23,4 | 127 |
| Agudela | 15,0 | nd | nd | nd | nd | 1,28 | 7,57 | 1,73 | nd | nd | 45,0 | 26,9 | 97,5 |
| Salinas | 41,0 | nd | nd | nd | nd | 7,21 | 12,9 | nd | nd | nd | 34,2 | 1,23 | 96,5 |
| Canide Norte | 47,3 | nd | nd | nd | nd | 55,9 | nd | nd | nd | nd | nd | 2,06 | 105 |
| Canide Sul | 48,6 | nd | nd | nd | nd | 8,81 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 57,4 |
| Madalena Norte | 21,7 | nd | 1,86 | nd | nd | 5,33 | nd | nd | nd | nd | nd | 7,36 | 36,2 |
| Sãozinha | 36,2 | nd | nd | nd | nd | 30,5 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 66,8 |
| Luzerna-das-praias | | | | | | | | | | | | | |
| | DPMI | ADBI | AHMI | EXA | MA | HHCB | MX | AHTN | MM | MT | MK | EB | Σ |
| Angeiras Norte | 9,03 | nd | 2,62 | nd | nd | 4,46 | nd | 1,86 | nd | nd | 39,5 | 47,9 | 105 |
| Funtão | 9,70 | nd | nd | nd | nd | 6,15 | 4,58 | 1,70 | nd | nd | nd | 45,4 | 67,6 |
| Agudela | 18,7 | nd | nd | nd | nd | 1,27 | nd | 1,83 | nd | nd | 54,3 | 55,2 | 131 |
| Memória | 15,5 | nd | 2,35 | nd | nd | 4,54 | 8,39 | 1,65 | nd | nd | 51,6 | 93,8 | 178 |
| Paraíso | 30,0 | nd | nd | nd | nd | 1,30 | 9,00 | 2,71 | nd | nd | 24,4 | 8,99 | 76,4 |
| Salinas | 21,1 | nd | nd | nd | nd | 12,0 | nd | 1,85 | nd | nd | 49,5 | 55,5 | 140 |
| Estrela do Mar | 38,4 | nd | nd | nd | nd | 40,4 | nd | nd | nd | nd | nd | 108 | 187 |
| Canide Norte | 27,6 | nd | 1,95 | nd | nd | 33,7 | nd | nd | nd | nd | 24,0 | 147 | 234 |
| Canide Sul | 5,45 | nd | 1,70 | nd | nd | 41,0 | nd | nd | nd | nd | 24,9 | 43,6 | 117 |
| Madalena Norte | 20,1 | nd | 0,75 | nd | nd | 26,4 | nd | nd | nd | nd | 16,7 | 23,3 | 87,3 |
| Valadares Norte | 7,59 | nd | nd | nd | nd | < LD | nd | nd | nd | nd | nd | 3,79 | 11,5 |
| Dunas Mar | 5,52 | nd | 0,94 | nd | nd | 5,30 | nd | nd | nd | nd | nd | 99,1 | 111 |
| Sãozinha | 5,28 | nd | 1,40 | nd | nd | 1,26 | nd | nd | nd | nd | nd | 78,3 | 86,2 |
| Areia Branca | 6,08 | nd | 1,37 | nd | nd | 23,5 | nd | nd | nd | nd | nd | 45,4 | 76,4 |
| Feno-das-areias | | | | | | | | | | | | | |
| | DPMI | ADBI | AHMI | EXA | MA | HHCB | MX | AHTN | MM | MT | MK | EB | Σ |
| Salinas | 43,4 | nd | nd | nd | nd | 11,2 | 10,4 | 4,23 | nd | nd | 56,6 | 52,7 | 178 |
| Canide Norte | 45,5 | nd | nd | nd | nd | 99,8 | nd | nd | nd | nd | nd | 279 | 425 |
| Canide Sul | 22,1 | nd | 2,27 | nd | nd | 71,6 | nd | nd | nd | nd | 18,4 | nd | 114 |
| Madalena Norte | 43,1 | nd | nd | nd | nd | 63,0 | nd | nd | nd | nd | 25,3 | 160 | 291 |

nd - não detetado; LD - limite de deteção; DPMI - *cashmeran*; ADBI - *celestolide*; AHMI - *phantolide*; EXA - *exaltolide*; MA - *musk ambrette*; HHCB - *galaxolide*; MX - *musk xylene*; AHTN - *tonalide*; MM - *musk moskene*; MT - *musk tibetene*; MK - *musk ketone*; EB - *ethylene brassylate*

Analisando as concentrações totais de *musks* detetados por espécie vegetal e local (Tabela 4.4 e Figura 4.2), pode-se verificar que o chorão parece ser a espécie que tem uma maior capacidade de acumular os *musks* sintéticos, apresentando níveis de concentração desde aproximadamente 300

ng/g dw até perto de 600 ng/g dw, dependendo do local de recolha. A eruca e o feno parecem ser as espécies que, a seguir ao chorão, conseguem melhor captar este tipo de compostos, sendo a luzerna e a morganheira as espécies com menor acumulação destes compostos. Curiosamente, pela análise desta figura verifica-se que as espécies vegetais com maior teor em água (chorão, eruca e feno) são as que mais acumulam os *musks* sintéticos. Por outro lado, as espécies com menor teor em água e com maior teor lipídico são as que apresentam menores concentrações de *musks*. Isto pode-se justificar pelas reações que ocorrem no metabolismo das plantas, em que as que apresentam maior quantidade de lípidos têm uma maior capacidade em degradar ou metabolizar estes compostos (Schmid & Ohlrogge, 2002).

A amostra de chorão da praia de Angeiras Norte apresenta a maior concentração total de *musks* e pelo contrário a amostra de luzerna da praia de Valadares Norte apresenta a concentração total mais baixa. A praia de Angeiras Norte foi o local onde se detetaram concentrações mais elevadas de *musks* no chorão (579 ng/g dw) e na morganheira-das-praias (127 ng/g dw). Já Canide Norte foi a praia onde a concentração de *musks* na eruca-marinha (389 ng/g dw), luzerna-das-praias (234 ng/g dw) e feno-das-areias (425 ng/g dw) foi mais elevada.

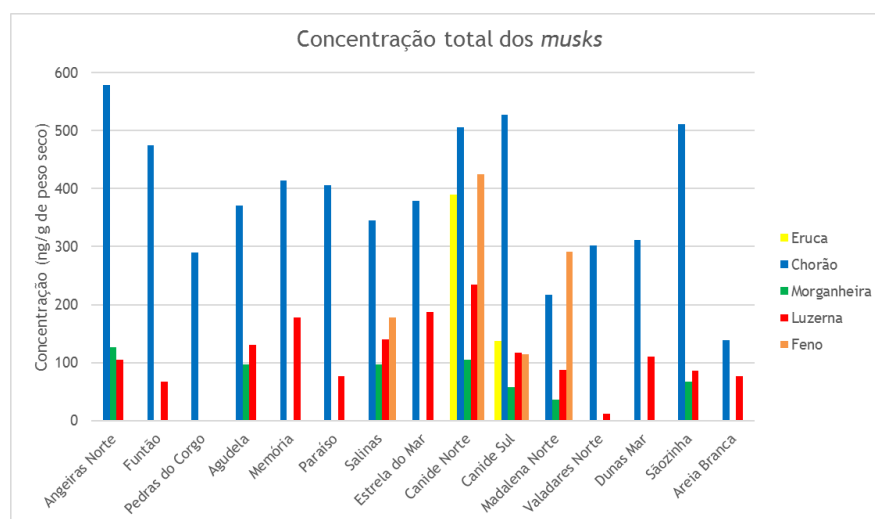


Figura 4.2 - Níveis de concentração total dos *musks* detetados nas amostras.

Como mencionado anteriormente, cada espécie vegetal estudada parece ter capacidades distintas para acumular diferentes *musks* sintéticos. Na Figura 4.3 analisou-se a distribuição dos compostos-alvo em todas as espécies através da sua concentração média.

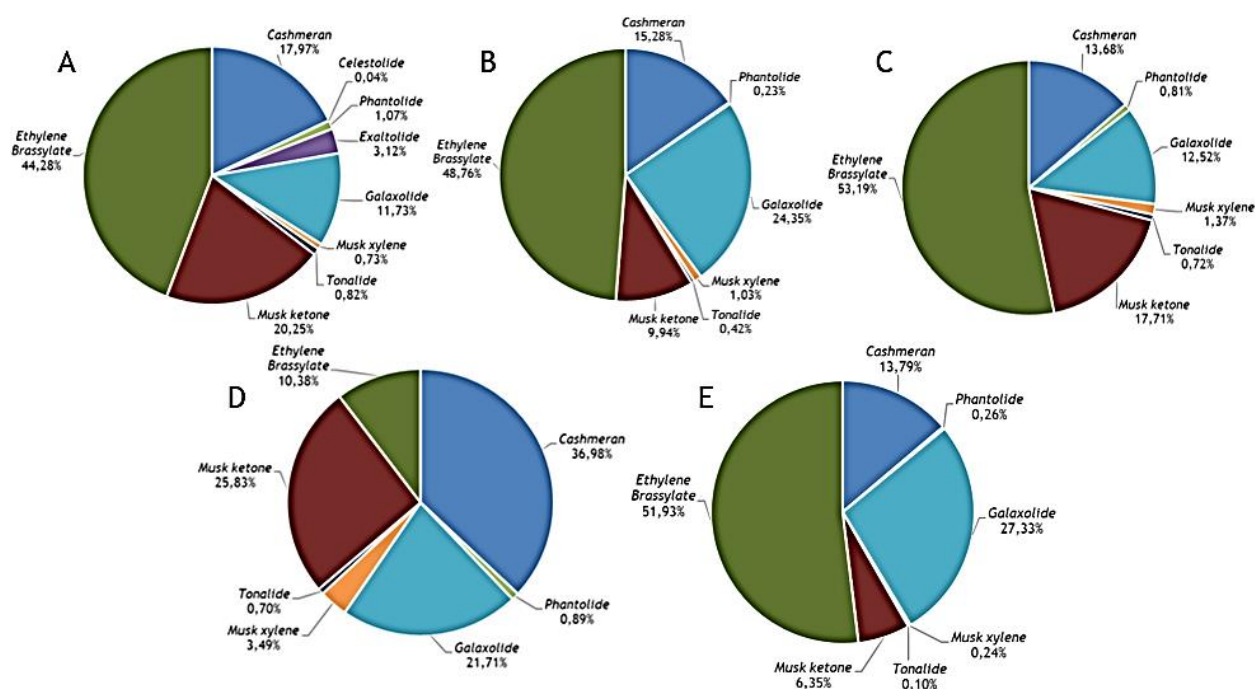


Figura 4.3 - Frequências de detecção médias de cada musk sintético nas diferentes espécies vegetais. Distribuição dos musks detetados: A - no chorão; B - no feno; C - na luzerna; D - na morganheira; E - na eruca.

Analisando a Figura 4.3, verifica-se que o musk macrocíclico *ethylene brassylate* é o composto com maior frequência de detecção, para todas as plantas exceto para a morganheira, em que o composto mais detetado é o *cashmeran*. As percentagens de detecção do *ethylene brassylate* são geralmente próximas dos 50% para o chorão, feno, luzerna e eruca, podendo-se justificar pelo facto de os musks macrocíclicos apresentarem uma estrutura semelhante a outros compostos de origem natural que possam fazer parte da composição destas plantas e deste composto ser o mais solúvel em água em conjunto com o *cashmeran*. Apesar de se encontrarem presentes em todas as espécies, os musks indicados como sendo os mais comercializados na UE (95% do total de musks vendidos - *tonalide* e *galaxolide*) não foram os que apresentaram maior percentagem de detecção nas espécies vegetais da orla costeira. O *cashmeran*, *galaxolide* e *musk ketone* apresentam-se em grandes percentagens de detecção, logo a seguir ao *ethylene brassylate*. O *musk xylene*, apesar do seu uso nos produtos cosméticos estar proibido na UE desde 2011, ainda é detetado no ambiente, como se verifica em todas as plantas, com uma percentagem de detecção superior a 0,24% e menor que 3,49%.

Muitos fatores podem influenciar a concentração detetada dos musks sintéticos nas plantas. A deposição atmosférica, a captação na zona da rizosfera, as condições ambientais circundantes, condições meteorológicas, a direção do vento, a temperatura do ar, galgamentos e o uso destes produtos pelos frequentadores das zonas costeiras são alguns deles. Os efluentes provenientes das ETARs são um dos meios de dispersão destes contaminantes no ambiente, como já mencionado anteriormente. Para a análise da influência destes efluentes na concentração detetada de musks nas espécies vegetais da orla costeira analisadas, elaborou-se a Figura 4.4, onde se varia as

concentrações totais detetadas nas praias com a distância à ETAR mais próxima, como já descrito anteriormente.

Se a relação entre a distância à ETAR e a concentração dos *musks* fosse uma razão linear, era expectável que a concentração dos *musks* aumentasse com a proximidade a uma ETAR. No entanto, o que a Figura 4.4 demonstra é que não há uma razão linear, e que a concentração dos *musks* nas plantas está dependente de outros fatores que não só a proximidade a um efluente de ETAR. No entanto, observa-se que a praia mais distante de uma ETAR (Areia Branca) apresenta menor concentração de *musks*.

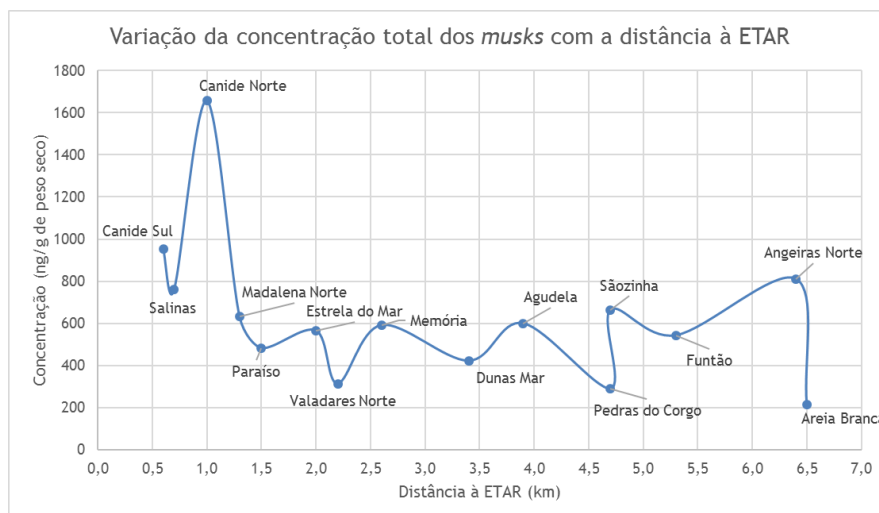


Figura 4.4 - Representação da variação da concentração total dos *musks* detetados nas praias com a distância à ETAR mais próxima.

Analisando outro dos fatores que pode ter influência na concentração detetada de *musks* nas plantas dunares, como é o número de utilizadores das praias, o resultado é o verificado na Figura 4.5.

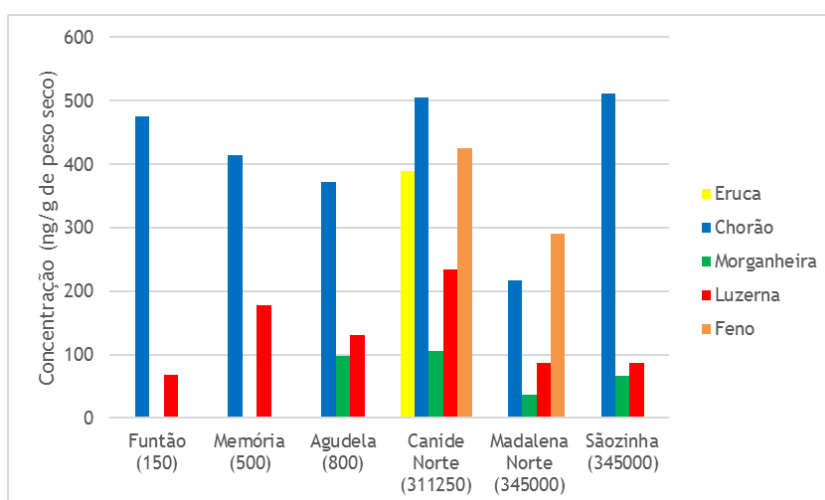


Figura 4.5 - Representação da variação da concentração total dos *musks* detetados em cada planta com o número de utilizadores das praias na época balnear.

Desta figura pode-se concluir que a relação entre o número de utilizadores das praias na época balnear e a concentração destes compostos nas espécies vegetais da orla costeira também

não é linear. Na teoria, um maior número de utilizadores das praias conduziria a uma maior concentração de *musks* no meio ambiente, mas a existência de outros fatores impede a comprovação desta hipótese teórica. Ainda assim verifica-se que Canide Norte apresenta uma maior concentração total de *musks*, sendo das praias mais frequentadas. Esta análise simplificada de fatores não permite compreender esta variação da concentração de *musks*, sendo por isso necessário o uso de estatística avançada multivariada, permitindo o cruzamento dos dados de várias variáveis em simultâneo.

Um resumo de todos os resultados apresentados anteriormente está presente na Tabela 4.5, nomeadamente com os valores da concentração média, gamas de concentrações detetadas e número de deteções dos *musks* sintéticos.

Tabela 4.5 - Resumo dos resultados obtidos para os *musks* com as concentrações em ng/g de peso seco

| Eruca-marinha | | | |
|----------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Concentração média | Gama de concentrações | Frequência de deteção |
| <i>Cashmeran</i> | 53,9 | 31,9-75,9 | 2 |
| <i>Celestolide</i> | | nd | |
| <i>Phantolide</i> | | nd | |
| <i>Exaltolide</i> | | nd | |
| <i>Musk ambrette</i> | | nd | |
| <i>Galaxolide</i> | 131 | 40,1-221 | 2 |
| <i>Musk xylene</i> | | nd | |
| <i>Tonalide</i> | | nd | |
| <i>Musk moskene</i> | | nd | |
| <i>Musk tibetene</i> | | nd | |
| <i>Musk ketone</i> | 28,4 | nd-56,7 | 1 |
| <i>Ethylene Brassylate</i> | 50,4 | 21,7-79,2 | 2 |
| Chorão | | | |
| | Concentração média | Gama de concentrações | Frequência de deteção |
| <i>Cashmeran</i> | 69,1 | nd-169 | 14 |
| <i>Celestolide</i> | 0,14 | nd-2,14 | 1 |
| <i>Phantolide</i> | 4,12 | nd-8,74 | 11 |
| <i>Exaltolide</i> | 12,0 | nd-180 | 1 |
| <i>Musk ambrette</i> | | nd | |
| <i>Galaxolide</i> | 45,1 | 3,29-143 | 15 |
| <i>Musk xylene</i> | 2,79 | nd-15,7 | 3 |
| <i>Tonalide</i> | 3,14 | nd-17,0 | 7 |
| <i>Musk moskene</i> | | nd | |
| <i>Musk tibetene</i> | | nd | |
| <i>Musk ketone</i> | 77,9 | nd-201 | 12 |
| <i>Ethylene Brassylate</i> | 170 | 14,5-336 | 15 |
| Morganheira-das-praias | | | |
| | Concentração média | Gama de concentrações | Frequência de deteção |
| <i>Cashmeran</i> | 31,0 | 7,12-48,6 | 7 |
| <i>Celestolide</i> | | nd | |
| <i>Phantolide</i> | 0,75 | nd-3,38 | 2 |
| <i>Exaltolide</i> | | nd | |
| <i>Musk ambrette</i> | | nd | |
| <i>Galaxolide</i> | 18,2 | 1,28-55,9 | 7 |
| <i>Musk xylene</i> | 2,92 | nd-12,9 | 2 |
| <i>Tonalide</i> | 0,59 | nd-2,39 | 2 |
| <i>Musk moskene</i> | | nd | |
| <i>Musk tibetene</i> | | nd | |
| <i>Musk ketone</i> | 21,6 | nd-72,3 | 3 |
| <i>Ethylene Brassylate</i> | 8,70 | nd-26,9 | 5 |

nd - não detetado; LD - limite de deteção

Tabela 4.5 - Resumo dos resultados obtidos para os *musks* com as concentrações em ng/g de peso seco (continuação)

| Luzerna-das-praias | | | |
|----------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Concentração média | Gama de concentrações | Frequência de deteção |
| <i>Cashmeran</i> | 15,7 | 5,28-38,4 | 14 |
| <i>Celestolide</i> | | nd | |
| <i>Phantolide</i> | 0,93 | nd-2,62 | 8 |
| <i>Exaltolide</i> | | nd | |
| <i>Musk ambrette</i> | | nd | |
| <i>Galaxolide</i> | 14,4 | < LD-41,0 | 14 |
| <i>Musk xylene</i> | 1,57 | nd-9,00 | 3 |
| <i>Tonalide</i> | 0,83 | nd-2,71 | 6 |
| <i>Musk moskene</i> | | nd | |
| <i>Musk tibetene</i> | | nd | |
| <i>Musk ketone</i> | 20,3 | nd-54,3 | 8 |
| <i>Ethylene Brassylate</i> | 61,1 | 3,79-147 | 14 |
| Feno-das-areias | | | |
| | Concentração média | Gama de concentrações | Frequência de deteção |
| <i>Cashmeran</i> | 38,5 | 22,1-45,5 | 4 |
| <i>Celestolide</i> | | nd | |
| <i>Phantolide</i> | 0,57 | nd-2,27 | 1 |
| <i>Exaltolide</i> | | nd | |
| <i>Musk ambrette</i> | | nd | |
| <i>Galaxolide</i> | 61,4 | 11,2-99,8 | 4 |
| <i>Musk xylene</i> | 2,60 | nd-10,4 | 1 |
| <i>Tonalide</i> | 1,06 | nd-4,23 | 1 |
| <i>Musk moskene</i> | | nd | |
| <i>Musk tibetene</i> | | nd | |
| <i>Musk ketone</i> | 25,1 | nd-56,6 | 3 |
| <i>Ethylene Brassylate</i> | 123 | nd-279 | 3 |

nd - não detetado; LD - limite de deteção

Tanto quanto é do conhecimento do autor, não há até à data estudos relativos à deteção de *musks* sintéticos em plantas dunares, tornando impossível a comparação dos resultados deste estudo com outros utilizando a mesma matriz. Há, no entanto, publicações que detetaram *musks* sintéticos noutras espécies vegetais. Um estudo sobre a deteção destes compostos nas agulhas de pinheiro elaborado por Silva *et al.* (2015) apresentou como resultados a deteção de *cashmeran* (0,22-72,60 ng/g dw), *celestolide* (0,09-0,29 ng/g dw), *galaxolide* (15,94-216,36 ng/g dw) e *tonalide* (2,03-5,59 ng/g dw), valores dentro da gama de resultados obtidos neste estudo. A justificação dada pelos autores para estas concentrações são o domínio do mercado por parte do *galaxolide* e *tonalide* e a grande volatilidade do *cashmeran*. A não deteção dos *musks ambrette*, *moskene*, *tibetene* e *ketone* é justificada pela proibição e restrição que a legislação europeia impõe sobre estes compostos. A deteção de *tonalide* (0,4-3,7 ng/g), *musk ketone* (0,03 ng/g), *galaxolide* (0,4 ng/g) e *celestolide* (0,04 ng/g) foi efetuada por Aguirre *et al.* (2014) na cenoura, pimenta e alface. Relativamente aos resultados obtidos, verifica-se que também se identificaram estes compostos nas espécies vegetais da orla costeira. Um outro estudo elaborado por Macherius *et al.* (2012) conseguiu identificar o *galaxolide* (810-1770 ng/g) e *tonalide* (2320-12660 ng/g) na cenoura, cevada e festuca dos prados.

A explicação para que estes compostos apareçam nestas concentrações nas plantas dunares pode depender de vários fatores, sendo o mais perceptível a quantidade de utilizadores das praias. Outras hipóteses podem entrar nesta discussão, pois ainda não se conhece bem o metabolismo destas plantas, podendo o seu estudo resultar em algumas conclusões quanto à sua capacidade de

acumulação destes compostos. As demais variáveis ambientais também têm influência no transporte e deposição dos *musks*, mas estudos que avaliem estas variáveis ainda não são conhecidos.

4.5 Filtros-UV nas espécies vegetais da orla costeira

Quanto à presença dos filtros-UV nas 42 amostras analisadas, verifica-se uma detecção destes compostos em todas elas. Apenas quatro filtros UVB orgânicos foram analisados: cânfora de 3-(4'-metilbenzilideno) (4-MBC), benzoato de 2-etil-hexil 4-dimetilamino (EDP), 4-metoxicinamato de 2-etil-hexilo (EMC) e 2-ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etil-hexilo (octocrileno) (OC). As concentrações são apresentadas em peso seco das plantas, após a determinação do teor de água, como referido anteriormente.

Os resultados da detecção dos filtros-UV nas plantas recolhidas estão descritos na Tabela 4.6. Apenas o OC não foi detetado em todas as plantas recolhidas. O EMC foi o único filtro-UV detetado em todas as amostras desde concentrações de 1,74 ng/g dw até 8899 ng/g dw. O EDP e o EMC apresentam-se em elevadas concentrações em todas as amostras de morganheira, não havendo uma explicação certa para que tal ocorra. Tal pode ocorrer pela presença de compostos naturais com uma estrutura química similar na própria planta. A amostra com maior concentração total de filtros-UV é a morganheira, colhida na praia de Sãozinha (12201 ng/g dw). A amostra com menor concentração total é a luzerna, recolhida na praia de Angeiras Norte (11,9 ng/g dw).

Tabela 4.6 - Concentrações dos filtros-UV em todas as amostras de plantas em ng/g de peso seco

| Eruca-marinha | | | | | |
|-----------------|-------|------|------|------|------|
| | 4-MBC | EDP | EMC | OC | Σ |
| Canide Norte | nd | 133 | 138 | nd | 271 |
| Canide Sul | 2,06 | 348 | 39,3 | nd | 389 |
| Chorão | | | | | |
| | 4-MBC | EDP | EMC | OC | Σ |
| Angeiras Norte | nd | 11,0 | 12,0 | nd | 23,1 |
| Funtão | nd | 166 | 5,88 | nd | 172 |
| Pedras do Corgo | 52,4 | 196 | 6,10 | nd | 254 |
| Agudela | nd | 28,1 | 19,2 | nd | 47,3 |
| Memória | 83,1 | nd | 2,48 | nd | 85,6 |
| Paraíso | 107 | nd | 6,20 | nd | 113 |
| Salinas | 2,76 | 14,0 | 16,9 | nd | 33,6 |
| Estrela do Mar | nd | 33,3 | 21,6 | 39,4 | 94,3 |
| Canide Norte | nd | 45,2 | 38,9 | 13,7 | 97,8 |
| Canide Sul | nd | 57,2 | 62,7 | nd | 120 |
| Madalena Norte | nd | 322 | 166 | nd | 487 |
| Valadares Norte | nd | 496 | 907 | nd | 1402 |
| Dunas Mar | nd | 43,2 | 44,0 | nd | 87,1 |
| Sãozinha | nd | 34,3 | 30,3 | nd | 64,6 |
| Areia Branca | nd | 299 | 708 | nd | 1008 |

nd - não detetado

Tabela 4.6 - Concentrações dos filtros-UV em todas as amostras de plantas em ng/g de peso seco (continuação)

| Morganheira-das-praias | | | | | |
|------------------------|-------|------|------|------|-------|
| | 4-MBC | EDP | EMC | OC | Σ |
| Angeiras Norte | 5,72 | 766 | 2369 | nd | 3141 |
| Agudela | nd | 791 | 1953 | nd | 2744 |
| Salinas | 44,0 | 825 | 2670 | nd | 3539 |
| Canide Norte | 111 | 1646 | 3661 | nd | 5418 |
| Canide Sul | 224 | 961 | 2412 | nd | 3597 |
| Madalena Norte | 316 | 711 | 1377 | nd | 2403 |
| Sãozinha | 259 | 3042 | 8899 | nd | 12201 |
| Luzerna-das-praias | | | | | |
| | 4-MBC | EDP | EMC | OC | Σ |
| Angeiras Norte | 2,90 | 1,69 | 7,29 | nd | 11,9 |
| Funtão | nd | 19,9 | 5,97 | nd | 25,9 |
| Agudela | nd | 11,3 | 1,74 | nd | 13,0 |
| Memória | 3,86 | 3,00 | 17,5 | nd | 24,3 |
| Paraíso | 30,4 | 7,45 | 7,37 | nd | 45,2 |
| Salinas | nd | 3,47 | 5,25 | 22,6 | 31,3 |
| Estrela do Mar | nd | 6,74 | 14,8 | 29,2 | 50,8 |
| Canide Norte | nd | 37,0 | 18,3 | 8,67 | 64,0 |
| Canide Sul | nd | 36,5 | 6,75 | nd | 43,3 |
| Madalena Norte | nd | 24,0 | 17,4 | nd | 41,4 |
| Valadares Norte | nd | nd | 41,7 | 34,2 | 75,9 |
| Dunas Mar | nd | 8,52 | 17,3 | 8,16 | 33,9 |
| Sãozinha | nd | nd | 7,26 | 37,5 | 44,8 |
| Areia Branca | 29,4 | 9,54 | 35,2 | 6,95 | 81,1 |
| Feno-das-areias | | | | | |
| | 4-MBC | EDP | EMC | OC | Σ |
| Salinas | nd | 9,67 | 2,63 | nd | 12,3 |
| Canide Norte | nd | nd | 27,7 | nd | 27,7 |
| Canide Sul | nd | 20,0 | 39,0 | nd | 59,0 |
| Madalena Norte | 56,3 | nd | 55,8 | nd | 112 |

nd - não detetado

A planta com maior teor em lípidos (morganheira) é a que apresenta uma maior capacidade de acumulação destes filtros-UV em relação às restantes. A seguir à morganheira, o chorão é a planta com maior capacidade de acumulação destes compostos, seguida da eruca e do feno, como se verifica pela Figura 4.6.

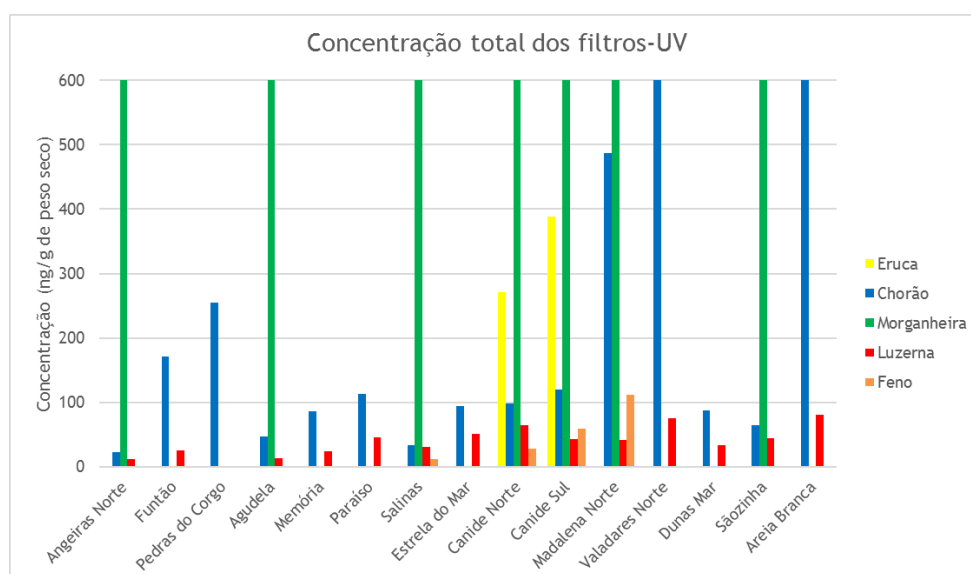


Figura 4.6 - Níveis de concentração total dos filtros-UV detetados nas amostras.

Apesar de estes compostos estarem restringidos pela legislação da UE, estes resultados demonstram que estão presentes no ambiente em altas concentrações. As concentrações de 4-MBC e EMC podem ser justificadas pela grande comercialização de produtos contendo estes compostos. Em concentração total, a praia com maior deteção de filtros-UV na eruca foi Canide Sul, para o chorão Valadares Norte, para a morganheira Sãozinha, para a luzerna Areia Branca e para o feno Madalena Norte. A distribuição por percentagem dos vários filtros-UV detetados pelas cinco espécies vegetais estudadas nas praias em concentração média encontra-se retratada na Figura 4.7.

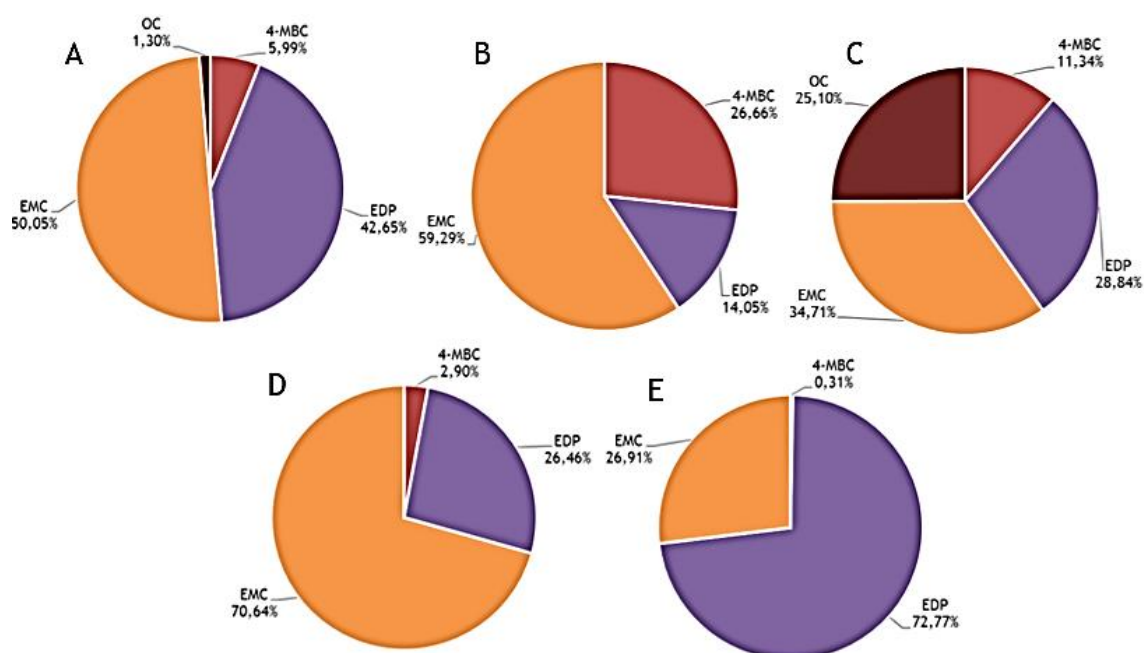


Figura 4.7 - Frequências de deteção médias de cada filtro-UV nas diferentes espécies vegetais. Distribuição dos filtros-UV detetados: A - no chorão; B - no feno; C - na luzerna; D - na morganheira; E - na eruca.

Por análise destes gráficos verifica-se que cada espécie tem uma distribuição dos filtros-UV detetados muito particular. Nas espécies vegetais de chorão, feno, luzerna e morganheira, o composto mais detetado é o EMC entre 34,71% a 70,64%. Na eruca, o EDP é o mais detetado a 72,77%. O OC apenas é detetado no chorão e na luzerna, sendo estas as espécies em que são detetados todos os filtros-UV analisados. Destes compostos o OC é o que apresenta menor solubilidade em água e é o mais lipofílico, todos os restantes filtros-UV apresentam propriedades idênticas.

Como já referido anteriormente a distribuição dos filtros-UV pelo meio ambiente e a sua concentração vão depender de diversos fatores. Os principais fatores que levam os filtros-UV até à zona costeira são o transporte pelos utilizadores de protetores solares, e outros cosméticos que contenham estes compostos, e pelos efluentes de ETARs. A Figura 4.8 apresenta a relação entre a concentração total de filtros-UV nas praias e a distância à ETAR mais próxima.

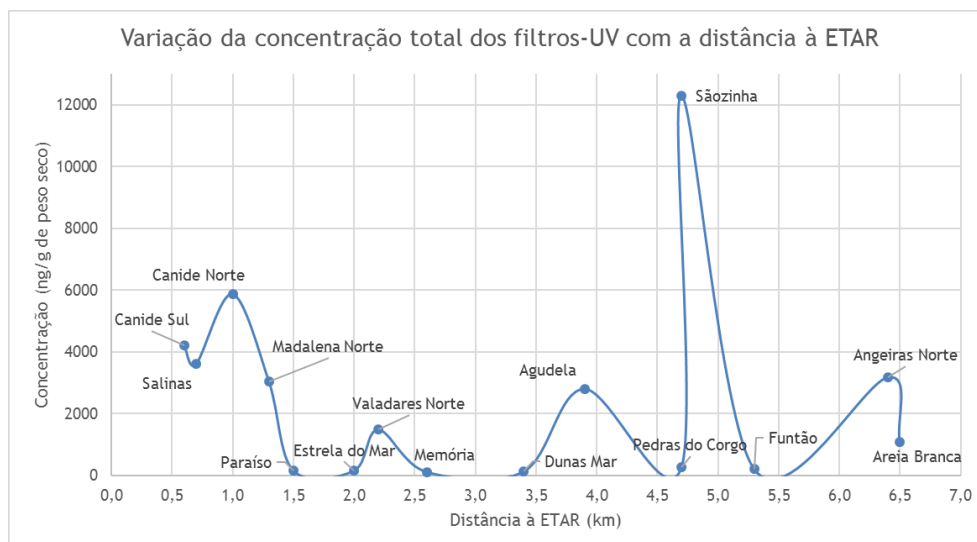


Figura 4.8 - Representação da variação da concentração total dos filtros-UV detetados nas praias com a distância à ETAR mais próxima.

Pela análise desta figura verifica-se que não há uma relação linear entre a distância à ETAR mais próxima e a concentração total de filtros-UV detetada em cada amostra. Esta relação linear não se dá por causa da interferência de outros fatores que influenciam a degradação e o transporte destes compostos até serem acumulados. O mesmo acontece para a relação entre a concentração total de filtros-UV e o número de utilizadores das praias em época balnear, tal como demonstra a Figura 4.9. Apesar disso, verifica-se uma maior concentração numa das praias mais frequentadas (Sãozinha).

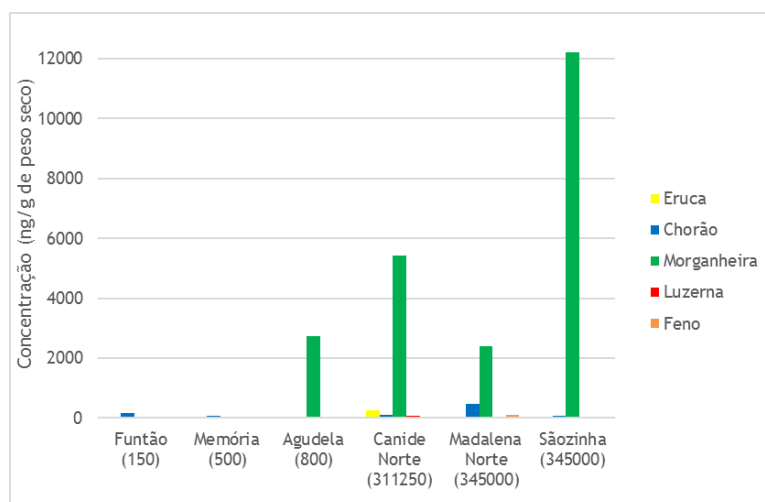


Figura 4.9 - Representação da variação da concentração total dos filtros-UV detetados em cada planta com o número de utilizadores das praias na época balnear.

Na Tabela 4.7 estão apresentados os principais resultados deste estudo, nomeadamente a concentração média dos filtros-UV em cada planta, as gamas de concentrações e a frequência com que são detetados os compostos. Até à data e tanto quanto é do conhecimento do autor, não existem publicações que tenham detetado os filtros-UV 4-MBC, EDP, EMC e OC nas plantas, impossibilitando a comparação com os resultados obtidos. É, por isso, essencial uma maior informação quer sobre a

deteção de filtros-UV em espécies vegetais como sobre os vários fatores que afetam a dispersão e acumulação destes compostos pelo ambiente.

Tabela 4.7 - Resumo dos resultados obtidos para os filtros-UV com as concentrações em ng/g de peso seco

| Eruca-marinha | | | | |
|------------------------|---------|----------|-----------|---------|
| | 4-MBC | EDP | EMC | OC |
| Concentração média | 1,03 | 240 | 88,8 | |
| Gamas de concentrações | nd-2,06 | 133-348 | 39,3-138 | nd |
| Frequência de deteção | 1 | 2 | 2 | |
| Chorão | | | | |
| | 4-MBC | EDP | EMC | OC |
| Concentração média | 16,3 | 116 | 136 | 3,55 |
| Gamas de concentrações | nd-107 | nd-496 | 2,48-907 | nd-39,4 |
| Frequência de deteção | 4 | 13 | 15 | 2 |
| Morganheira-das-praias | | | | |
| | 4-MBC | EDP | EMC | OC |
| Concentração média | 137 | 1249 | 3334 | |
| Gamas de concentrações | nd-316 | 711-3042 | 1377-8899 | nd |
| Frequência de deteção | 6 | 7 | 7 | |
| Luzerna-das-praias | | | | |
| | 4-MBC | EDP | EMC | OC |
| Concentração média | 4,75 | 12,1 | 14,6 | 10,5 |
| Gamas de concentrações | nd-30,4 | nd-37,0 | 1,74-41,7 | nd-37,5 |
| Frequência de deteção | 4 | 12 | 14 | 7 |
| Feno-das-areias | | | | |
| | 4-MBC | EDP | EMC | OC |
| Concentração média | 14,1 | 7,41 | 31,3 | |
| Gamas de concentrações | nd-56,3 | nd-20,0 | 2,63-55,8 | nd |
| Frequência de deteção | 1 | 2 | 4 | |

nd - não detetado

5 Conclusões

Usando a metodologia de extração e *clean-up* QuEChERS seguido de análise por GC-MS foram analisados 12 *musks* sintéticos e 4 filtros-UV em 5 espécies diferentes de plantas dunares (eruca, chorão, morganheira, luzerna e feno). Foram recolhidas um total de 42 amostras de 15 praias diferentes entre Matosinhos e Vila Nova de Gaia. O método analítico provou ser indicado para a deteção dos compostos em questão, com resultados satisfatórios para a precisão (coeficientes de variação normalmente inferiores a 15%) e exatidão (recuperações médias de 93%). Os valores dos limites de deteção variaram entre 0,003 ng/g (*ethylene brassylate*) e 1,32 ng/g (*musk ambrette*).

Os *musks* sintéticos e os filtros-UV foram detetados em todas as amostras analisadas. As espécies vegetais com maior teor de água (chorão e eruca) revelaram-se melhores acumuladoras de *musks*, enquanto a planta com maior teor em lípidos (morganheira) foi a que apresentou uma maior capacidade de acumulação de filtros-UV. O chorão também se revelou apropriado para a biomonitorização dos filtros-UV analisados.

O *ethylene brassylate* foi o composto detetado em maior concentração (336 ng/g dw) na amostra de chorão da praia de Canide Norte. Foi também o *musk* mais encontrado nas amostras analisadas. As praias com valores totais mais elevados de *musks* foi de Angeiras Norte para o chorão e morganheira e Canide Norte para as restantes. O filtro-UV mais detetado foi o EMC (4-metoxicinamato de 2-etil-hexilo) sendo a concentração mais alta detetada de 8899 ng/g dw na amostra de morganheira da praia de Sãozinha. Esta foi a praia com maior valor total de filtros-UV.

Não foi possível relacionar os níveis de concentração detetados com a distância à ETAR mais próxima e com o número de utilizadores das praias na época balnear, pois nenhuma das relações foram lineares, o que revelou que a acumulação e dispersão destes compostos no ambiente é algo bastante complexo, requerendo uma análise estatística multivariada de todos estes parâmetros.

A principal conclusão deste estudo foi que as espécies vegetais da orla costeira mostraram ser boas bioamostradoras de acumulação, quer de *musks* sintéticos, quer de filtros-UV, pois foi possível detetar grande parte dos compostos nas amostras recolhidas de 5 espécies diferentes. Apenas os *nitromusks musk ambrette*, *musk moskene* e *musk tibetene* não foram detetados, o que pode ser explicado pelo facto da sua utilização nos produtos cosméticos estar proibida na União Europeia. O chorão foi a espécie cujos resultados mostraram ser a que acumula melhor os *musks* sintéticos e a morganheira os filtros-UV.

6 Limitações e trabalho futuro

As maiores dificuldades deste trabalho foi a falta de disponibilidade do GC-MS, pelo facto de ser utilizado por diversos investigadores do laboratório. A amostragem revelou-se difícil pela dificuldade em encontrar as espécies vegetais em vastas áreas, por vezes cobertas por areias, em que o acesso é possibilitado apenas por passadiços.

Como trabalho futuro propõe-se o alargamento do plano de monitorização, recolhendo um maior número de amostras e de espécies, em diferentes estações do ano e noutros locais, de modo a verificar qual a influência das condições ambientais de diferentes períodos do ano nas concentrações detetadas nos compostos em estudo. O alargamento do estudo a um maior número de filtros-UV poder-se-ia revelar interessante (abrangendo também filtros UVA orgânicos), permitindo uma visão mais completa do tipo de acumulação destes compostos nas plantas dunares. A realização de ensaios de precisão intermédia é também uma sugestão de trabalho futuro, visto não ter sido possível a sua execução neste trabalho.

As condições de extração dos compostos das espécies vegetais em causa podiam ser otimizadas para cada planta, através de um desenho experimental, permitindo extrações mais eficientes. De modo a elaborar um projeto de investigação completo seria necessário justificar as diferentes concentrações detetadas em cada amostra e, para isso, diversos parâmetros deviam ser tidos em conta, nomeadamente: a deteção destes compostos no ar, água do mar, areia e eventualmente em efluentes de ETARs próximas às praias.

Um artigo científico será submetido na Science of Total Environment (H. Ribeiro, S. Ramos, V. Homem, L. Santos, Coastline plant species as biosamplers of accumulation of UV-filters and synthetic musks).

Referências

- Abramsson-Zetterberg, L., & Slanina, P. (2002). Macrocyclic musk compounds - An absence of genotoxicity in the Ames test and the in vivo micronucleus assay. *Toxicology Letters*, 135(1-2), 155-163. doi:10.1016/S0378-4274(02)00257-6
- Abreu, M. M., Santos, E. S., Magalhães, M. C. F., & Fernandes, E. (2012). Trace elements tolerance, accumulation and translocation in *Cistus populifolius*, *Cistus salviifolius* and their hybrid growing in polymetallic contaminated mine areas. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 52-60. doi:10.1016/j.gexplo.2012.05.001
- Acosta, A., Carranza, M. L., & Izzi, C. F. (2009). Are there habitats that contribute best to plant species diversity in coastal dunes? *Biodiversity and Conservation*, 18(4), 1087-1098. doi:10.1007/s10531-008-9454-9
- Aguirre, J., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Fernández, L. Á., Zuloaga, O., & Prieto, A. (2014). Development of stir-bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of musks in vegetables and amended soils. *Analytica Chimica Acta*, 812, 74-82. doi:10.1016/j.aca.2013.12.036
- Amine, H., Gomez, E., Halwani, J., Casellas, C., & Fenet, H. (2012). UV filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene and ethylhexyl dimethyl PABA from untreated wastewater in sediment from eastern Mediterranean river transition and coastal zones. *Marine Pollution Bulletin*, 64(11), 2435-2442. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.07.051
- Anastassiades, M., & Lehotay, S. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431.
- Arbulu, M., Sampedro, M. C., Unceta, N., Gómez-Caballero, A., Goicolea, M. A., & Barrio, R. J. (2011). A retention time locked gas chromatography-mass spectrometry method based on stir-bar sorptive extraction and thermal desorption for automated determination of synthetic musk fragrances in natural and wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1218(20), 3048-3055. doi:10.1016/j.chroma.2011.03.012
- Associação Bandeira Azul da Europa. (2009). No Title. <http://www.abae.pt/home/inicio.php>. Accessed 11 June 2016
- Aydin, M. E., Tor, A., & Özcan, S. (2006). Determination of selected polychlorinated biphenyls in soil by miniaturised ultrasonic solvent extraction and gas chromatography-mass-selective detection. *Analytica Chimica Acta*, 577(2), 232-237. doi:10.1016/j.aca.2006.06.050
- Balmer, M. E., Buser, H. R., Müller, M. D., & Poiger, T. (2005). Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes. *Environmental Science and Technology*, 39(4), 953-962. doi:10.1021/es040055r
- Barker, S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 151-162. doi:10.1016/j.jbbm.2006.06.005
- Barón, E., Gago-Ferrero, P., Gorga, M., Rudolph, I., Mendoza, G., Zapata, A. M., et al. (2013). Occurrence of hydrophobic organic pollutants (BFRs and UV-filters) in sediments from South

- America. *Chemosphere*, 92(3), 309-316. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.032
- Beier, C., & Gundersen, P. (1989). Atmospheric deposition to the edge of a spruce forest in Denmark. *Environmental Pollution*, 60(3-4), 257-271. doi:10.1016/0269-7491(89)90108-5
- Belsito, D., Bickers, D., Bruze, M., Calow, P., Dagli, M. L., Dekant, W., et al. (2012). A toxicologic and dermatologic assessment of cyclopentanones and cyclopentenones when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, 50(SUPPL.3), 318-361. doi:10.1016/j.fct.2012.04.019
- Bester, K. (2009). Analysis of musk fragrances in environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 1216(3), 470-480. doi:10.1016/j.chroma.2008.08.093
- Bester, K., & Theobald, N. (1998). Results of non target screening of lipophilic organic pollutants in the German Bight V: Xanthen-9-one. *Water Research*, 34(8), 2277-2282. doi:10.1016/S0043-1354(99)00377-2
- Biorede. (2016). *Medicago marina* L.
- Boxall, A. B. A., Rudd, M. A., Brooks, B. W., Caldwell, D. J., Choi, K., Hickmann, S., et al. (2012). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environment Health Perspectives*, 120(9), 1221-1229. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.012
- Bratkovics, S., & Sapozhnikova, Y. (2011). Determination of seven commonly used organic UV filters in fresh and saline waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 3(12), 2943. doi:10.1039/c1ay05390f
- Brausch, J. M., & Rand, G. M. (2011). A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, 82(11), 1518-1532. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.018
- Breitholtz, M., Wollenberger, L., & Dinan, L. (2003). Effects of four synthetic musks on the life cycle of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic Toxicology*, 63(2), 103-118. doi:10.1016/S0166-445X(02)00159-5
- Calderón-Preciado, D., Jiménez-Cartagena, C., Matamoros, V., & Bayona, J. M. (2011). Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading. *Water Research*, 45(1), 221-231. doi:10.1016/j.watres.2010.07.050
- Calderón-Preciado, D., Jiménez-Cartagena, C., Peñuela, G., & Bayona, J. M. (2009). Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(5), 1319-1327. doi:10.1007/s00216-009-2669-0
- Caliman, F. A., & Gavrilescu, M. (2009). Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - A review. *Clean - Soil, Air, Water*, 37(4-5), 277-303. doi:10.1002/clen.200900038
- Capriotti, A., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubiotti, R., Samperi, R., & Lagana, A. (2010). Recent Developments in matrix solid phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2521-2532. doi:10.1016/j.chroma.2010.01.030
- Carlsson, G., & Norrgren, L. (2004). Synthetic Musk Toxicity to Early Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(1), 102-105. doi:10.1007/s00244-003-2288-2

- Carpinteiro, I., Abuín, B., Rodríguez, I., Cela, R., & Ramil, M. (2010). Headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry for the sensitive determination of benzotriazole UV stabilizers in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(2), 829-839. doi:10.1007/s00216-010-3584-0
- Castro, S., Davis, L. C., & Erickson, L. E. (2004). Temperature and pH effects on plant uptake of benzotriazoles by sunflowers in hydroponic culture. *International journal of phytoremediation*, 6(March 2015), 209-225. doi:10.1080/16226510490496384
- Cérantola, S., Bessieres, M.-A., Magné, C., & Deslandes, E. (2005). Occurrence of the unusual amino acid N5-(hydroxymethyl-2,5-dihydro-2-furyl)-l-allo-γ-hydroxyglutamine in *Honkenya peploides* (L.) Ehrh. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(11), 1187-1189. doi:10.1016/j.bse.2005.05.001
- Chase, D. A., Karnjanapiboonwong, A., Fang, Y., Cobb, G. P., Morse, A. N., & Anderson, T. A. (2012). Occurrence of synthetic musk fragrances in effluent and non-effluent impacted environments. *Science of the Total Environment*, 416, 253-260. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.11.067
- Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Donald, H., Mishler, B. D., et al. (1993). Phylogenetics of Seed Plants : An Analysis of Nucleotide Sequences from the Plastid Gene *rbcL*, 528-580.
- Chen, C. H., Zhou, Q. X., Cai, Z., & Wang, Y. Y. (2010). Effects of soil polycyclic musk and cadmium on pollutant uptake and biochemical responses of wheat (*Triticum aestivum*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(4), 564-573. doi:10.1007/s00244-010-9522-5
- Chen, F., Huber, C., May, R., & Schröder, P. (2016). Metabolism of oxybenzone in a hairy root culture: Perspectives for phytoremediation of a widely used sunscreen agent. *Journal of Hazardous Materials*, 306, 230-236. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.022
- Chen, G., Jiang, R., Qiu, J., Cai, S., Zhu, F., & Ouyang, G. (2015). Environmental fates of synthetic musks in animal and plant: An in vivo study. *Chemosphere*, 138, 584-591. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.07.003
- Chisvert, A., León-González, Z., Tarazona, I., Salvador, A., & Giokas, D. (2012). An overview of the analytical methods for the determination of organic ultraviolet filters in biological fluids and tissues. *Analytica Chimica Acta*, 752, 11-29. doi:10.1016/j.aca.2012.08.051
- Clara, M., Gans, O., Windhofer, G., Krenn, U., Hartl, W., Braun, K., et al. (2011). Occurrence of polycyclic musks in wastewater and receiving water bodies and fate during wastewater treatment. *Chemosphere*, 82(8), 1116-1123. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.041
- Clemens, S., Palmgren, M. G., & Krämer, U. (2002). A long way ahead: Understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, 7(7), 309-315. doi:10.1016/S1360-1385(02)02295-1
- Clement, R. E., & Taguchi, V. Y. (1991). Techniques for the Gas Chromatography - Mass Spectrometry Identification of Organic Compounds in Effluents. *Laboratory Services Branch*, (June), 1-45. doi:0-7729-59834
- Correia, M. de L. M., & Fidalgo, M. L. (1995). *Estudo de avaliação da vulnerabilidade da capacidade de recepção das águas e zonas costeiras em Portugal*. IHRH.
- Cunha, S. C., Fernandes, J. O., Vallecillos, L., Cano-Sancho, G., Domingo, J. L., Pocurull, E., et al. (2015). Co-occurrence of musk fragrances and UV-filters in seafood and macroalgae collected in

- European hotspots. *Environmental Research*, 143, 65-71. doi:10.1016/j.envres.2015.05.003
- Daughton, C. G. (2001). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Overarching Issues and Overview. In *Pharmaceuticals and Care Products in the Environment* (Vol. 28, pp. 2744-2753).
- Daughton, C. G., & Ternes, T. A. (1999). Special Report: Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, 107, Suppl. doi:10.1289/ehp.99107s6907
- David, F., & Sandra, P. (2007). Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *Journal of Chromatography A*, 1152(1-2), 54-69. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.032
- De La Rosa, G., Peralta-Videa, J. R., Montes, M., Parsons, J. G., Cano-Aguilera, I., & Gardea-Torresdey, J. L. (2004). Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere*, 55(9), 1159-1168. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.01.028
- Delipetrou, P. (2006). *Carpobrotus edulis*. *Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe*.
- Dinis, M. de L. (2007). Modelos Fenomenológicos de Distribuição Intercompartimental de Substâncias Radioactivas, II. [http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/11855/3/Texto integral - Volume I.pdf](http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/11855/3/Texto%20integral%20Volume%20I.pdf)
- Dobashi, Y., Yuyama, T., & Ohkatsu, Y. (2007). Interaction of ultraviolet absorbers. *Polymer Degradation and Stability*, 92(7), 1227-1233. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.03.024
- ECHA. (2016). Registered substances. *Database on information on registered substances under REACH by search on CAS No.* <http://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/registered-substances>. Accessed 10 April 2016
- Eh, M. (2004). New Alicyclic Musks: The Fourth Generation of Musk Odorants. *Perspectives in Flavor and Fragrance Research*, 1, 145-154. doi:10.1002/9783906390475.ch12
- EPA. (2012). 5. Estimating Physical / Chemical and Environmental Fate Properties with EPI Suite™. In *Sustainable Futures / P2 Framework Manual 2012 EPA-748-B12-001* (pp. 1-22).
- European Commission. (2011). Commission Regulation (EU) No 143/2011 of 17 February 2011. *Official Journal of the European Union*, L44(54), 2-6.
- Ewing, G. W. (1998). *Métodos Instrumentais de Análise Química - Volume II* (Edgard Blu.).
- Fent, K., Kunz, P. Y., Zenker, A., & Rapp, M. (2010). A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. *Marine Environmental Research*, 69(SUPPL. 1), S4-S6. doi:10.1016/j.marenvres.2009.10.010
- Fernández, V. (2009). Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization, 1-67.
- Ferreira, P. J. O., Pinto da Silva, L., Miranda, M. S., & Esteves da Silva, J. C. G. (2014). Gas-phase molecular structure and energetics of UVB filter 4-methylbenzylidene camphor: A computational study. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1033, 67-73. doi:10.1016/j.comptc.2014.02.010
- Foltz, J., Abdul Mottaleb, M., Meziari, M. J., & Rafiq Islam, M. (2014). Simultaneous detection and quantification of select nitromusks, antimicrobial agent, and antihistamine in fish of grocery stores by gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere*, 107, 187-193.

doi:10.1016/j.chemosphere.2013.12.032

- Forster, W. A., Zabkiewicz, J. A., & Riederer, M. (2006). Mechanisms of cuticular uptake of xenobiotics into living plants: Evaluation of a logistic-kinetic penetration model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 3025-3032. doi:10.1021/jf0528916
- Gago-Ferrero, P., Alonso, M. B., Bertozzi, C. P., Marigo, J., Barbosa, L., Cremer, M., et al. (2013). First determination of UV filters in marine mammals. octocrylene levels in Franciscana dolphins. *Environmental Science and Technology*, 47(11), 5619-5625. doi:10.1021/es400675y
- Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2015). UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. *Science of the Total Environment*, 518-519, 518-525. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.026
- Gan, J., Papiernik, S. K., Koskinen, W. C., & Yates, S. R. (1999). Evaluation of Accelerated Solvent Extraction (ASE) for Analysis of Pesticide Residues in Soil Evaluation of Accelerated Solvent Extraction (ASE) for Analysis of Pesticide Residues in Soil. *Environmental Science & Technology*, (JULY 1999). doi:10.1021/es990145
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, 32(1), 147-156. doi:10.1016/j.nbt.2014.01.001
- Geira. (2016). Origem e evolução de um sistema dunar (3). <http://www.geira.pt/aple/dunas4.html>. Accessed 6 April 2016
- Gilbert, E., Pirot, F., Bertholle, V., Roussel, L., Falson, F., & Padois, K. (2013). Commonly used UV filter toxicity on biological functions: Review of last decade studies. *International Journal of Cosmetic Science*, 35(3), 208-219. doi:10.1111/ics.12030
- Giokas, D. L., Salvador, A., & Chisvert, A. (2007). UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(5), 360-374. doi:10.1016/j.trac.2007.02.012
- Gomes, P. T., Botelho, A. C., & Carvalho, G. S. (2002). *Sistemas dunares do litoral de esposende*.
- Han, C., Xia, B., Chen, X., Shen, J., Miao, Q., & Shen, Y. (2016). Determination of four paraben-type preservatives and three benzophenone-type ultraviolet light filters in seafoods by LC-QqLIT-MS/MS. *Food Chemistry*, 194, 1199-1207. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.093
- Haubensak, K., & Smyth, A. (1996). *Cakile maritima*, (1988), 1-4.
- Hawthorne, S. B., Grabanski, C. B., Martin, E., & Miller, D. J. (2000). Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: Recovery, selectivity and effects on sample matrix. *Journal of Chromatography A*, 892(1-2), 421-433. doi:10.1016/S0021-9673(00)00091-1
- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and assessment of polycyclic musk residues in the aquatic environment of urban areas - A review. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 30(5-6), 227-243. doi:10.1002/ahch.200390005
- Hellström, A. (2004). Uptake of Organic Pollutants in Plants, 1-40.
- Heneen, W. K. (1963). Extensive chromosome breakage occurring spontaneously in a certain individual of *elymus factus* (=agropyron junceum), (1940).
- Heneweer, M., Muusse, M., Van Den Berg, M., & Sanderson, J. T. (2005). Additive estrogenic effects of

- mixtures of frequently used UV filters on pS2-gene transcription in MCF-7 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 208(2), 170-177. doi:10.1016/j.taap.2005.02.006
- Hennion, M. C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of chromatography. A*, 856, 3-54. doi:10.1016/S0021-9673(99)00832-8
- HERA. (2004). *HERA Environmental Risk Assessment Polycyclic musks AHTN and HHCB*. <http://www.heraproject.com/files/28-E-36551E10-F8EF-E807-E4199B9BB0076A9F.pdf>
- Hites, R. A. (1997). Gas Chromatography - Mass Spectrometry. In *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry* (pp. 609-624).
- Hofkamp, L., Bradley, S., Tresguerres, J., Lichtensteiger, W., Schlumpf, M., & Timms, B. (2008). Region-specific growth effects in the developing rat prostate following fetal exposure to estrogenic ultraviolet filters. *Environmental Health Perspectives*, 116(7), 867-872. doi:10.1289/ehp.10983
- Hutter, H. P., Wallner, P., Moshhammer, H., Hartl, W., Sattelberger, R., Lorbeer, G., & Kundi, M. (2005). Blood concentrations of polycyclic musks in healthy young adults. *Chemosphere*, 59(4), 487-492. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.01.070
- Jurado, A., Gago-Ferrero, P., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., Pujades, E., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2014). Urban groundwater contamination by residues of UV filters. *Journal of Hazardous Materials*, 271, 141-149. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.01.036
- Kaiser, D., Sieratowicz, A., Zielke, H., Oetken, M., Hollert, H., & Oehlmann, J. (2012). Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. *Environmental Pollution*, 163, 84-90. doi:10.1016/j.envpol.2011.12.014
- Kallenborn, R., Gatermann, R., Planting, S., Rimkus, G. G., Lund, M., Schlabach, M., & Burkow, I. C. (1999). Gas chromatographic determination of synthetic musk compounds in Norwegian air samples. *Journal of Chromatography A*, 846(1-2), 295-306. doi:10.1016/S0021-9673(99)00259-9
- Kanel, J. S., & Marentis, R. T. (1999). Process for fluid/dense gas extraction under enhanced solubility conditions.
- Kim, J.-W., Chang, K.-H., Isobe, T., & Tanabe, S. (2011). Acute toxicity of benzotriazole ultraviolet stabilizers on freshwater crustacean (*Daphnia pulex*). *The Journal of toxicological sciences*, 36(2), 247-51. doi:10.2131/jts.36.247
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., & Abdelly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3-4), 244-249. doi:10.1016/j.plaphy.2007.02.001
- Lai, H. J., Ying, G. G., Ma, Y. B., Chen, Z. F., Chen, F., & Liu, Y. S. (2014). Occurrence and dissipation of benzotriazoles and benzotriazole ultraviolet stabilizers in biosolid-amended soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(4), 761-767. doi:10.1002/etc.2498
- Langford, K. H., Reid, M. J., Fjeld, E., Øxnevad, S., & Thomas, K. V. (2015). Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway. *Environment International*, 80, 1-7. doi:10.1016/j.envint.2015.03.012
- Lautenschlager, S., Wulf, H. C., & Pittelkow, M. R. (2007). Photoprotection. *Lancet*, 370(9586), 528-537. doi:10.1016/S0140-6736(07)60638-2
- LeDoux, M. (2011). Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *Journal of Chromatography A*, 1218(8), 1021-1036.

doi:10.1016/j.chroma.2010.12.097

- LeFevre, G. H., Muller, C. E., Li, R. J., Luthy, R. G., & Sattely, E. S. (2015). Rapid Phytotransformation of Benzotriazole Generates Synthetic Tryptophan and Auxin Analogs in Arabidopsis. *Environmental Science and Technology*, 49(18), 10959-10968. doi:10.1021/acs.est.5b02749
- Liu, H., Huang, L., Chen, Y., Guo, L., Li, L., Zhou, H., & Luan, T. (2015). Simultaneous determination of polycyclic musks in blood and urine by solid supported liquid-liquid extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 992, 96-102. doi:10.1016/j.jchromb.2015.04.028
- Lu, Y., Yuan, T., Wang, W., & Kannan, K. (2011). Concentrations and assessment of exposure to siloxanes and synthetic musks in personal care products from China. *Environmental Pollution*, 159(12), 3522-3528. doi:10.1016/j.envpol.2011.08.015
- Luque de Castro, M. D., & García-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1-10. doi:10.1016/S0003-2670(98)00233-5
- Macherius, A., Eggen, T., Lorenz, W. G., Reemtsma, T., Winkler, U., & Moeder, M. (2012). Uptake of galaxolide, tonalide, and triclosan by carrot, barley, and meadow fescue plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7785-7791. doi:10.1021/jf301917q
- Manirakiza, P., Covaci, A., & Schepens, P. (2001). Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(1), 93-100. doi:10.1006/jfca.2000.0972
- Martins, A., Vasas, A., Viveiros, M., Molnar, J., Hohmann, J., & Amaral, L. (2011). Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(5), 438-444. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.01.016
- Martins, M. C., Neto, C. S., & Costa, J. C. (2013). The meaning of mainland Portugal beaches and dunes' psammophilic plant communities: A contribution to tourism management and nature conservation. *Journal of Coastal Conservation*, 17(3), 279-299. doi:10.1007/s11852-013-0232-9
- Matamoros, V., Calderón-Preciado, D., Domínguez, C., & Bayona, J. M. (2012). Analytical procedures for the determination of emerging organic contaminants in plant material: A review. *Analytica Chimica Acta*, 722, 8-20. doi:10.1016/j.aca.2012.02.004
- Matamoros, V., Nguyen, L. X., Arias, C. A., Nielsen, S., Laugen, M. M., & Brix, H. (2012). Musk fragrances, DEHP and heavy metals in a 20 years old sludge treatment reed bed system. *Water Research*, 46(12), 3889-3896. doi:10.1016/j.watres.2012.04.027
- Matsler, A. L., & Siebenmorgen, T. J. (2005). Evaluation of operating conditions for surface lipid extraction from rice using a soxtec system. *Cereal Chemistry*, 82(3), 282-286. doi:10.1094/CC-82-0282
- McGinty, D., Letizia, C. S., & Api, A. M. (2011). Fragrance material review on ethylene brassylate. *Food and Chemical Toxicology*, 49(SUPPL. 2), S174-S182. doi:10.1016/j.fct.2011.07.023
- Mikkelsen, S. H., Lassen, C., Warming, M., Hansen, E., Brinch, A., Brooke, D., et al. (2015). *Survey and health assessment of UV filters*.
- Mitra, S. (2003). *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. doi:10.1002/0471457817
- Montesdeoca-Esponda, S., Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2013).

- Extraction and determination methodologies for benzotriazole UV stabilizers in personal-care products in environmental and biological samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 51, 23-32. doi:10.1016/j.trac.2013.05.012
- Morohoshi, K., Yamamoto, H., Kamata, R., Shiraishi, F., Koda, T., & Morita, M. (2005). Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicology in Vitro*, 19(4), 457-469. doi:10.1016/j.tiv.2005.01.004
- Mottaleb, M. A., Osemwengie, L. I., Islam, M. R., & Sovocool, G. W. (2012). Identification of bound nitro musk-protein adducts in fish liver by gas chromatography-mass spectrometry: Biotransformation, dose-response and toxicokinetics of nitro musk metabolites protein adducts in trout liver as biomarkers of exposure. *Aquatic Toxicology*, 106-107, 164-172. doi:10.1016/j.aquatox.2011.11.010
- Nakata, H., Hinosaka, M., & Yanagimoto, H. (2015). Macrocyclic-, polycyclic-, and nitro musks in cosmetics, household commodities and indoor dusts collected from Japan: Implications for their human exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 248-255. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.09.032
- Nakata, H., Murata, S., & Filatreau, J. (2009). Occurrence and concentrations of benzotriazole UV stabilizers in marine organisms and sediments from the Ariake Sea, Japan. *Environmental Science and Technology*, 43(18), 6920-6926. doi:10.1021/es900939j
- Negreira, N., Rodríguez, I., Rubí, E., & Cela, R. (2010). Dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of UV filters in environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 995-1004. doi:10.1007/s00216-010-4009-9
- Nohynek, G. J., & Schaefer, H. (2001). Benefit and risk of organic ultraviolet filters. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 33(3), 285-99. doi:10.1006/rtp.2001.1476
- Osemwengie, L. I., & Steinberg, S. (2001). On-site solid-phase extraction and laboratory analysis of ultra-trace synthetic musks in municipal sewage effluent using gas chromatography-mass spectrometry in the full-scan mode. *Journal of Chromatography A*, 932(1-2), 107-118. doi:10.1016/S0021-9673(01)01216-X
- Osgood, P. J., Moss, S. H., & Davies, D. J. G. (1982). The Sensitization of Near-Ultraviolet Radiation Killing of Mammalian Cells by the sunscreen agent para-aminobenzoic acid. *Journal of Investigative Dermatology*, 79(6), 354-357. doi:10.1111/1523-1747.ep12529409
- OSPAR. (2004). *Musk xylene and other musks. Hazardous Substances Series*.
- Paasivirta, J., Sinkkonen, S., Rantalainen, A. L., Broman, D., & Zebuhr, Y. (2002). Temperature dependent properties of environmentally important synthetic musks. *Environmental Science and Pollution Research*, 9(5), 345-355. doi:10.1065/espr2001.09.092
- Palm, M. D., & O'Donoghue, M. N. (2007). Update on photoprotection. *Dermatologic Therapy*, 20(5), 360-376. doi:10.1111/j.1529-8019.2007.00150.x
- Pan, J., Xia, X.-X., & Liang, J. (2008). Analysis of pesticide multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ultrasonics sonochemistry*, 15(1), 25-32. doi:10.1016/j.ultsonch.2007.06.005
- Parlamento Europeu. (2009). Regulamento (CE) N.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de Novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos (reformulação). *Jornal Oficial da União*

Europeia.

- Parque Biológico de Gaia. (2005). *As Plantas das Dunas de Gaia*.
- Peck, A. M., & Hornbuckle, K. C. (2006). Synthetic musk fragrances in urban and rural air of Iowa and the Great Lakes. *Atmospheric Environment*, 40(32), 6101-6111. doi:10.1016/j.atmosenv.2006.05.058
- Peng, X., Jin, J., Wang, C., Ou, W., & Tang, C. (2015). Multi-target determination of organic ultraviolet absorbents in organism tissues by ultrasonic assisted extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1384, 97-106. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.051
- Petrazzuoli, M. (2000). Advances in sunscreens. *Current Problems in Dermatology*, 12(6), 287-290. doi:10.1016/S1040-0486(00)90027-9
- Petrollini, E. (2011). *Medicago marina* (L.) seed: unravelling mechanisms controlling germination and dormancy.
- PIER. (2013). Polycarpon tetraphyllum. http://www.hear.org/pier/imagepages/singles/tropicos_100217279.htm. Accessed 25 February 2016
- Prestes, O. D., Friggi, C. A., Adaime, M. B., & Zanella, R. (2009). QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, 32(6), 1620-1634. doi:10.1590/S0100-40422009000600046
- Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2007). Ultrasound-assisted digestion: A useful alternative in sample preparation. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 299-310. doi:10.1016/j.jbbm.2006.09.006
- Prosen, H., & Zupančič-Kralj, L. (1999). Solid-phase microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 18(4), 272-282. doi:10.1016/S0165-9936(98)00109-5
- Ramirez, A. J., Brain, R. A., Usenko, S., Mottaleb, M. A., O'Donnell, J. G., Stahl, L. L., et al. (2009). Occurrence of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Fish: Results of a National Pilot Study in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2587-2597. doi:10.1897/08-561.1
- Ramírez, N., Marcé, R. M., & Borrull, F. (2011). Development of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry method for determining synthetic musks in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1218(1), 156-161. doi:10.1016/j.chroma.2010.11.006
- Ramos, S., Homem, V., Alves, A., & Santos, L. (2015). Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment - A review. *Science of the Total Environment*, 526, 278-311. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.04.055
- Regueiro, J., Llompart, M., Garcia-Jares, C., & Cela, R. (2007). Development of a high-throughput method for the determination of organochlorinated compounds, nitromusks and pyrethroid insecticides in indoor dust. *Journal of Chromatography A*, 1174(1-2), 112-124. doi:10.1016/j.chroma.2007.08.052
- Rimkus, G. G. (1999). Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicology Letters*, 111(1-2), 37-56. doi:10.1016/S0378-4274(99)00191-5

- Rodríguez-Sánchez, S., Martín-Ortiz, A., Carrero-Carralero, C., Ramos, S., Sanz, M. L., & Soria, A. C. (2016). Pressurized liquid extraction of *Aglaonema* sp. iminosugars: Chemical composition, bioactivity, cell viability and thermal stability. *Food Chemistry*, 204, 62-69. doi:10.1016/j.foodchem.2016.02.091
- Rodwell, J. S. (2000). *British plant communities - volume 5*.
- Sakkas, V. A., Giokas, D. L., Lambropoulou, D. A., & Albanis, T. A. (2003). Aqueous photolysis of the sunscreen agent octyl-dimethyl-p-aminobenzoic acid: Formation of disinfection byproducts in chlorinated swimming pool water. *Journal of Chromatography A*, 1016(2), 211-222. doi:10.1016/S0021-9673(03)01331-1
- Salvito, D. T., Vey, M. G. H., & Senna, R. J. (2004). Fragrance materials and their environmental impact. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(2), 105-108. doi:10.1002/ffj.1398
- Sambandan, D. R., & Ratner, D. (2011). Sunscreens: An overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 64(4), 748-758. doi:10.1016/j.jaad.2010.01.005
- Sánchez Rodríguez, A., Rodrigo Sanz, M., & Betancort Rodríguez, J. R. (2015). Occurrence of eight UV filters in beaches of Gran Canaria (Canary Islands). An approach to environmental risk assessment. *Chemosphere*, 131, 85-90. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.02.054
- Sauvé, S., & Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central journal*, 8, 15. doi:10.1186/1752-153X-8-15
- Sayed, M. D., Ryszk, A., Hammouda, F. M., El-Missiry, M. M., Williamson, E. M., & Evans, F. J. (1980). Constituents of Egyptian Euphorbiaceae. IX. Irritant and cytotoxic ingenane esters from *Euphorbia paralias* L. *Experientia* 36, 36(January), 4-5.
- Schimel, J. P. (1995). Plant transport and methane production as controls on methane flux from arctic wet meadow tundra. *Biogeochemistry*, 28(3), 183-200. doi:10.1007/BF02186458
- Schlumpf, M., Durrer, S., Faass, O., Ehnes, C., Fuetsch, M., Gaille, C., et al. (2008). Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: A review. *International Journal of Andrology*, 31(2), 144-150. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00856.x
- Schlumpf, M., Jarry, H., Wuttke, W., Ma, R., & Lichtensteiger, W. (2004). Estrogenic activity and estrogen receptor β binding of the UV filter 3-benzylidene camphor: Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicology*, 199(2-3), 109-120. doi:10.1016/j.tox.2004.02.015
- Schmid, K. M., & Ohlrogge, J. B. (2002). Lipid metabolism in plants. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 287-310.
- Schmidt, W. (1999). Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist*, 141(1), 1-26. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00331.x
- Scott, J. K. (2010). *Euphorbia paralias* L. - sea spurge. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*, 1, 1-9. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Serpone, N., Dondi, D., & Albini, A. (2007). Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta*, 360(3), 794-802. doi:10.1016/j.ica.2005.12.057
- Seyfried, M., Boschung, A., Miffon, F., Ohleyer, E., & Chaintreau, A. (2014). Elucidation of the upper pathway of alicyclic musk Romandolide® degradation in OECD screening tests with activated sludge. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(16), 9487-9494. doi:10.1007/s11356-013-2347-9

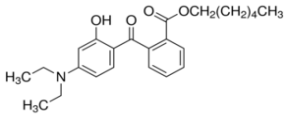
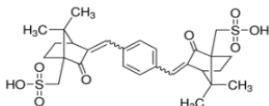
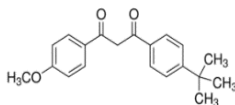
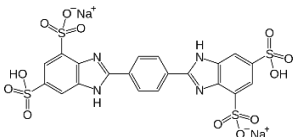
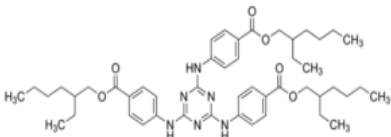
- Shaath, N. A. (2010). Ultraviolet filters. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 9(4), 464-469. doi:10.1039/b9pp00174c
- Silva, J. A., Ratola, N., Ramos, S., Homem, V., Santos, L., & Alves, A. (2015). An analytical multi-residue approach for the determination of semi-volatile organic pollutants in pine needles. *Analytica Chimica Acta*, 858(1), 24-31. doi:10.1016/j.aca.2014.12.042
- Sobek, A., Bejgarn, S., Rudén, C., Molander, L., & Breitholtz, M. (2013). In the shadow of the Cosmetic Directive - Inconsistencies in EU environmental hazard classification requirements for UV-filters. *Science of the Total Environment*, 461-462(JUNE 2013), 706-711. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.05.074
- Sommer, C. (2004). *Handbook of Environmental Chemistry. Part X vol. 3*.
- Sommer, C., & Juhl, H. (2004). Bestimmungmakrozyklischermoschus-Verbindungen in alkoholhaltigenkosmetica. *Lebensm.-Rundsch*, 224-229.
- Sporring, S., Bøwadt, S., Svensmark, B., & Björklund, E. (2005). Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls. *Journal of Chromatography A*, 1090(1-2), 1-9. doi:10.1016/j.chroma.2005.07.008
- Taamalli, M., Ghabriche, R., Amari, T., Mnasri, M., Zolla, L., Lutts, S., et al. (2014). Comparative study of Cd tolerance and accumulation potential between *Cakile maritima* L. (halophyte) and *Brassica juncea* L. *Ecological Engineering*, 71, 623-627. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.08.013
- Tan, B. L. L., Hawker, D. W., Müller, J. F., Tremblay, L. A., & Chapman, H. F. (2008). Stir bar sorptive extraction and trace analysis of selected endocrine disruptors in water, biosolids and sludge samples by thermal desorption with gas chromatography-mass spectrometry. *Water Research*, 42(1-2), 404-412. doi:10.1016/j.watres.2007.07.032
- Thomas, G. O., Sweetman, A. J., Parker, C. A., Kriebich, H., & Jones, K. C. (1998). Developement and validation of methods for trace determination of PCBs in biological matrices, 36(11), 2447-2459.
- Tsui, M. M. P., Leung, H. W., Wai, T.-C., Yamashita, N., Taniyasu, S., Liu, W., et al. (2014). Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. *Water Research*, 67, 55-65. doi:10.1016/j.watres.2014.09.013
- Vale, G., Rial-Otero, R., Mota, A., Fonseca, L., & Capelo, J. L. (2008). Ultrasonic-assisted enzymatic digestion (USAED) for total elemental determination and elemental speciation: A tutorial. *Talanta*, 75(4), 872-884. doi:10.1016/j.talanta.2007.12.037
- Vallecillos, L., Pocurull, E., & Borrull, F. (2013). A simple and automated method to determine macrocyclic musk fragrances in sewage sludge samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1314, 38-43. doi:10.1016/j.chroma.2013.09.033
- Wai, C. M., & Laintz, K. (1994). Supercritical fluid extraction.
- Wang, L., Asimakopoulou, A. G., Moon, H. B., Nakata, H., & Kannan, K. (2013). Benzotriazole, benzothiazole, and benzophenone compounds in indoor dust from the United States and East Asian countries. *Environmental Science and Technology*, 47(9), 4752-4759. doi:10.1021/es305000d

- Wang, S. Q., Balagula, Y., & Osterwalder, U. (2010). Photoprotection: A review of the current and future technologies. *Dermatologic Therapy*, 23(1), 31-47. doi:10.1111/j.1529-8019.2009.01289.x
- Weisbrod, C. J., Kunz, P. Y., Zenker, A. K., & Fent, K. (2007). Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225(3), 255-266. doi:10.1016/j.taap.2007.08.004
- Wilkowska, A., & Biziuk, M. (2011). Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 125(3), 803-812. doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.094
- Wolf, R., Wolf, D., Morganti, P., & Ruocco, V. (2001). Sunscreens. *Clinics in Dermatology*, 19(4), 452-459. doi:10.1016/S0738-081X(01)00190-0
- Wollenberger, L., Breitholtz, M., Kusk, K. O., & Bengtsson, B.-E. (2003). Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances. *The Science of the Total Environment*, 305, 53-64. doi:10.1016/S0048-9697(02)00471-0
- Wong, P. S. H. (1997). Ion Trap Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 54(1), 237-76. doi:10.1002/rcm.1290080114
- Xue, Z., Duan, L.-X., & Qi, X. (2015). Gas Chromatography Mass Spectrometry Coupling Techniques. In *Plant Metabolomics* (Vol. 2, pp. 92-99). doi:10.1007/978-94-017-9291-2
- Yang, M. J., & Pawliszyn, J. (1994). Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry*, 66(17), 844-853. doi:10.1021/ac00089a001
- Zhang, Z., Ren, N., Li, Y. F., Kunisue, T., Gao, D., & Kannan, K. (2011). Determination of benzotriazole and benzophenone UV filters in sediment and sewage sludge. *Environmental Science and Technology*, 45(9), 3909-3916. doi:10.1021/es2004057
- Zhou, L., Ji, Y., Zeng, C., Zhang, Y., Wang, Z., & Yang, X. (2013). Aquatic photodegradation of sunscreen agent p-aminobenzoic acid in the presence of dissolved organic matter. *Water Research*, 47(1), 153-162. doi:10.1016/j.watres.2012.09.045

Anexo 1 - Propriedades dos filtros-UV orgânicos


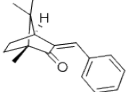
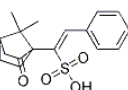
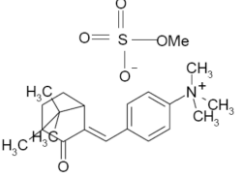
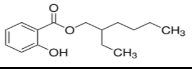
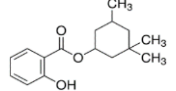
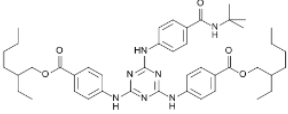
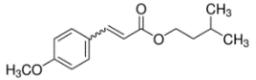
As principais propriedades físico-químicas dos filtros-UV orgânicos permitidos nos produtos cosméticos pelo Regulamento (CE) N.º 1223/2009 (Parlamento Europeu, 2009) encontram-se na Tabela A1.1.

Tabela A1.1 - Propriedades físico-químicas dos filtros-UV permitidos nos cosméticos pela UE

| Composto | | M (g/mol) | PE (°C) ^a | Log K _{OW} ^b | s (mg/L) ^b | Log BCF ^b |
|------------------------------------|---|-----------|----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Fórmula molecular | | | | | | |
| CAS# | | | | | | |
| Estrutura molecular | | | | | | |
| UVA | | | | | | |
| Derivados de benzofenona | 2-(4'-Dietilamino-2'-hidroxibenzoil)-benzoato de hexilo (DHHB) | | | | | |
| | <div>C₂₄H₃₁NO₄</div> <div>302776-68-7</div> <div></div> | | | | | |
| Derivados de cânfora | Ácido sulfônico de dicânfora de tereftalideno (Ecamsule) (TDSA) | | | | | |
| | <div>C₂₈H₃₄O₈S₂</div> <div>92761-26-7</div> <div></div> | | | | | |
| Derivados de dibenzoilmetano | 4-terc-butil 4'-metoxidibenzoilmetano (BMDM) | | | | | |
| | <div>C₂₀H₂₂O₃</div> <div>70356-09-1</div> <div></div> | | | | | |
| Derivados de benzimidazol | Disódio fenil dibenzimidazol tetrasulfonato (DPDT) | | | | | |
| | <div>C₂₀H₁₂N₄Na₂O₁₂S₄</div> <div>180898-37-7</div> <div></div> | | | | | |
| UVB | | | | | | |
| Derivados do ácido p-aminobenzóico | Etil-hexil triazona (EHT) | | | | | |
| | <div>C₄₈H₆₆N₆O₆</div> <div>88122-99-0</div> <div></div> | | | | | |

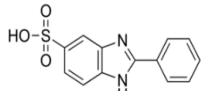
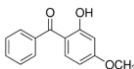
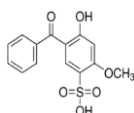
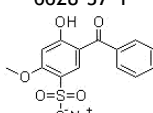
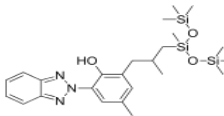
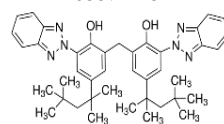
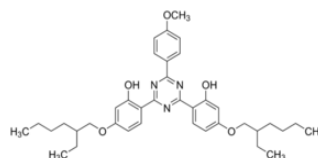
^aRoyal Society of Chemistry, 2015 - predicted using the ACD/Labs' ACD/PhysChem Suite; ^bUS Environmental Protection Agency's EPI Suite™, 2012; M - massa molar; PE - ponto de ebulição a 760 mmHg; K_{OW} - coeficiente de partilha octanol-água; s - solubilidade em água a 25 °C; BCF - fator de bioconcentração

Tabela A1.1 - Propriedades físico-químicas dos filtros-UV permitidos nos cosméticos pela UE (continuação)

| Composto | | M (g/mol) | PE (°C) ^a | Log K _{ow} ^b | s (mg/L) ^b | Log BCF ^b |
|------------------------------------|---|-----------|----------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------|
| Fórmula molecular | | | | | | |
| CAS# | | | | | | |
| Estrutura molecular | | | | | | |
| UVB | | | | | | |
| Derivados do ácido p-aminobenzoico | Etoilado etil-4-aminobenzoato (PEG-25 PABA) $C_{17}H_{27}NO_7$ 116242-27-4  | | | | | |
| | | 357,4 | 506 ^b | -0,7 | 2,06x10 ⁴ | 0,303 |
| Derivados de cânfora | Cânfora de 3-Benzilideno (3BC) $C_{17}H_{20}O$ 15087-24-8  | | | | | |
| | | 240,3 | 355 | 5,4 | 0,69 | 3,212 |
| | Ácido sulfônico de cânfora de benzilideno (BCSA) $C_{17}H_{20}O_4S$ 56039-58-8  | | | | | |
| | | 320,4 | 472 ^b | 2,2 | 120 | 0,500 |
| Derivados de cânfora | Metassulfato de cânfora de 3-(4'-benzilideno aquilamônio) (CBM) $C_{21}H_{31}NO_5S$ 52793-97-2  | | | | | |
| | | 409,5 | 682 ^b | -1,1 | 2,12x10 ⁴ | 0,500 |
| Derivados de salicilato | Salicilato de 2-etil-hexilo (ES) $C_{15}H_{22}O_3$ 118-60-5  | | | | | |
| | | 250,3 | 332 | 6,0 | 0,72 | 3,605 |
| Derivados de salicilato | Salicilato de 3,3,5-trimetilciclo-hexilo (HMS) $C_{16}H_{22}O_3$ 118-56-9  | | | | | |
| | | 262,3 | 341 | 6,2 | 0,42 | 3,733 |
| Derivados de triazina | Dietil-hexil butamido triazina (DBT) $C_{44}H_{59}N_7O_5$ 154702-15-5  | | | | | |
| | | 766,0 | 893 ^b | 14,0 | 1,33x10 ⁻¹¹ | 0,500 |
| Derivados de cinamato | 4-Metoxicinamato de isoamilo (IMC) $C_{15}H_{20}O_3$ 71617-10-2  | | | | | |
| | | 248,3 | 363 | 4,3 | 4,86 | 2,523 |

^aRoyal Society of Chemistry, 2015 - predicted using the ACD/Labs' ACD/PhysChem Suite; ^bUS Environmental Protection Agency's EPI Suite™, 2012; M - massa molar; PE - ponto de ebulição a 760 mmHg; K_{ow} - coeficiente de partilha octanol-água; s - solubilidade em água a 25 °C; BCF - fator de bioconcentração

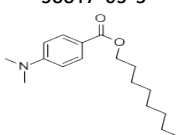
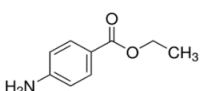
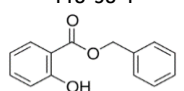
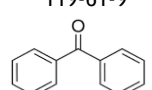
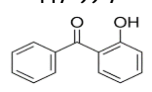
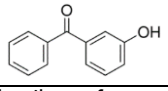
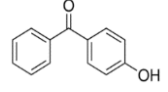
Tabela A1.1 - Propriedades físico-químicas dos filtros-UV permitidos nos cosméticos pela UE (continuação)

| Composto | | M (g/mol) | PE (°C) ^a | Log K _{ow} ^b | s (mg/L) ^b | Log BCF ^b |
|---------------------------|--|-----------|----------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------|
| Fórmula molecular | | | | | | |
| CAS# | | | | | | |
| Estrutura molecular | | | | | | |
| Derivados de benzimidazol | Ácido sulfônico de 2-fenil-5-benzimidazol (PBSA) C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₃ S 27503-81-7 | 274,3 | 566 ^b | -0,2 | 2,36x10 ⁴ | 0,500 |
| |  | | | | | |
| UVA/UVB | | | | | | |
| Derivados de benzofenona | 2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP3) C ₁₄ H ₁₂ O ₃ 131-57-7 | 228,2 | 370 | 3,5 | 68,6 | 1,583 |
| |  | | | | | |
| | 2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-ácido sulfônico (BP4) C ₁₄ H ₁₂ O ₆ S 4065-45-6 | 308,3 | 498 | 0,4 | 2,03x10 ⁴ | 0,500 |
| |  | | | | | |
| | 2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfonato de sódio (BP5) C ₁₄ H ₁₁ NaO ₆ S 6628-37-1 | 330,3 | 698 ^b | -1,4 | 5,05x10 ⁵ | 0,500 |
| |  | | | | | |
| Derivados de benzotriazol | Drometrizol trisiloxano (DTS) C ₂₄ H ₃₉ N ₃ O ₃ Si ₃ 155633-54-8 | 501,8 | 531 | 10,8 | 6,40x10 ⁻⁷ | 2,254 |
| |  | | | | | |
| | Metileno bis-benzotriazolil tetrametil butilfenol (MBBT) C ₄₁ H ₅₀ N ₆ O ₂ 103597-45-1 | 658,9 | 772 | 12,5 | 4,47x10 ⁻¹⁰ | 1,450 |
| |  | | | | | |
| Derivados de triazina | Bis-etil-hexiloxifenol metoxifenol triazina (BEMT) C ₃₈ H ₄₉ N ₃ O ₅ 187393-00-6 | 627,8 | 771 | 8,0 | 1,48x10 ⁻⁵ | 3,025 |
| |  | | | | | |

^aRoyal Society of Chemistry, 2015 - predicted using the ACD/Labs' ACD/PhysChem Suite; ^bUS Environmental Protection Agency's EPI Suite™, 2012; M - massa molar; PE - ponto de ebulição a 760 mmHg; K_{ow} - coeficiente de partilha octanol-água; s - solubilidade em água a 25 °C; BCF - fator de bioconcentração

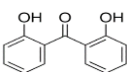
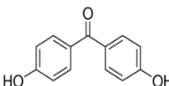
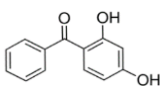
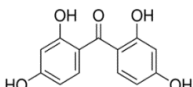
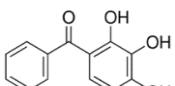
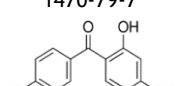
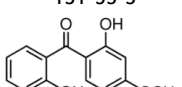
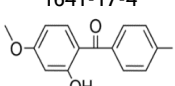
Os filtros-UV orgânicos cujo uso nos produtos cosméticos está proibido pelo Regulamento (CE) N.º 1223/2009 (Parlamento Europeu, 2009) são os apresentados na Tabela A1.2, onde constam também as principais propriedades destes compostos.

Tabela A1.2 - Propriedades físico-químicas dos filtros-UV orgânicos banidos dos produtos cosméticos na UE

| Composto | | M (g/mol) | PE (°C) ^a | Log K _{ow} ^b | s (mg/L) ^b | Log BCF ^b |
|--|---|-----------|----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Fórmula molecular | | | | | | |
| CAS# | | | | | | |
| Estrutura molecular | | | | | | |
| UVB | | | | | | |
| Derivados do ácido <i>p</i> -aminobenzoico | Octildimetil-ácido <i>p</i> -aminobenzoico (ODP) C ₁₇ H ₂₇ NO ₂ 58817-05-3  | 277,4 | 387 | 5,8 | 0,17 | 2,145 |
| | Etil 4-aminobenzoato etil-PABA (Et-PABA) C ₉ H ₁₁ NO ₂ 94-09-7  | 165,2 | 311 | 1,8 | 1671 | 0,894 |
| Derivados de salicilato | Salicilato de benzilo (Benzil-hidroxibenzoato) (BZS) C ₁₄ H ₁₂ O ₃ 118-58-1  | 228,2 | 320 | 4,3 | 24,6 | 2,512 |
| UVA/UVB | | | | | | |
| Derivados de benzofenona | Benzofenona (BP) C ₁₃ H ₁₀ O 119-61-9  | 182,2 | 305 | 3,2 | 103 | 1,180 |
| | 2-Hidroxibenzofenona (2HB) C ₁₃ H ₁₀ O ₂ 117-99-7  | 198,2 | 306 | 3,4 | 168 | 1,404 |
| | 3-Hidroxibenzofenona (3HB) C ₁₃ H ₁₀ O ₂ 13020-57-0  | 198,2 | 374 | 2,7 | 897 | 0,842 |
| | 4-Hidroxibenzofenona (4HB) C ₁₃ H ₁₀ O ₂ 1137-42-4  | 198,2 | 367 | 2,7 | 406 | 1,107 |

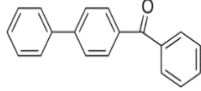
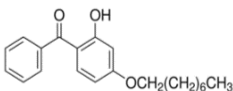
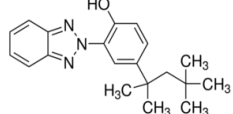
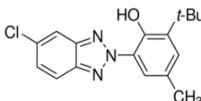
^aRoyal Society of Chemistry, 2015 - predicted using the ACD/Labs' ACD/PhysChem Suite; ^bUS Environmental Protection Agency's EPI Suite™, 2012; M - massa molar; PE - ponto de ebulição a 760 mmHg; K_{ow} - coeficiente de partilha octanol-água; s - solubilidade em água a 25 °C; BCF - fator de bioconcentração

Tabela A1.2 - Propriedades físico-químicas dos filtros-UV orgânicos banidos dos produtos cosméticos na UE (continuação)

| Composto | | M (g/mol) | PE (°C) ^a | Log K _{ow} ^b | s (mg/L) ^b | Log BCF ^b |
|--------------------------|---|-----------|----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Fórmula molecular | CAS# | | | | | |
| Estrutura molecular | | | | | | |
| Derivados de benzofenona | 2,2'-Di-hidroxibenzofenona (2DHB) C ₁₃ H ₁₀ O ₃ 835-11-0  | 214,2 | 329 | 3,7 | 89,7 | 1,550 |
| | 4,4'-Di-hidroxibenzofenona (4DHB) C ₁₃ H ₁₀ O ₃ 611-99-4  | 214,2 | 445 | 2,2 | 1905 | 0,525 |
| | 2,4-Di-hidroxibenzofenona (BP1) C ₁₃ H ₁₀ O ₃ 131-56-6  | 214,2 | 409 | 3,0 | 413 | 1,037 |
| | 2,2',4,4'-Tetra-hidroxibenzofenona (BP2) C ₁₃ H ₁₀ O ₅ 131-55-5  | 246,2 | 531 | 2,8 | 399 | 0,916 |
| | 2,3,4-Tri-hidroxibenzofenona (234THB) C ₁₃ H ₁₀ O ₄ 1143-72-2  | 230,2 | 440 | 2,9 | 381 | 0,999 |
| | 2,4,4'-Tri-hidroxibenzofenona (244THB) C ₁₃ H ₁₀ O ₄ 1470-79-7  | 230,2 | 488 | 2,5 | 873 | 0,721 |
| | 2,2'-Di-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP8) C ₁₄ H ₁₂ O ₄ 131-53-3  | 244,2 | 375 | 3,8 | 52,7 | 1,603 |
| | 2-Hidroxi-4-metoxi-4'-metilbenzofenona (BP10) C ₁₅ H ₁₄ O ₃ 1641-17-4  | 242,3 | 400 | 4,1 | 33,0 | 1,769 |

^aRoyal Society of Chemistry, 2015 - predicted using the ACD/Labs' ACD/PhysChem Suite; ^bUS Environmental Protection Agency's EPI Suite™, 2012; M - massa molar; PE - ponto de ebulição a 760 mmHg; K_{OW} - coeficiente de partilha octanol-água; s - solubilidade em água a 25 °C; BCF - fator de bioconcentração

Tabela A1.2 - Propriedades físico-químicas dos filtros-UV orgânicos banidos dos produtos cosméticos na UE
(continuação)

| Composto | | M (g/mol) | PE (°C) ^a | Log K _{ow} ^b | s (mg/L) ^b | Log BCF ^b |
|---------------------------|---|-----------|----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Fórmula molecular | | | | | | |
| CAS# | | | | | | |
| Estrutura molecular | | | | | | |
| UVA/UVB | | | | | | |
| Derivados de benzofenona | 4-Fenilbenzofenona (4PB) C ₁₉ H ₁₄ O 2128-93-0  | 258,3 | 419 | 4,9 | 1,36 | 2,322 |
| | 2-Hidroxi-4-octiloxibenzofenona (BP12) C ₂₁ H ₂₆ O ₃ 1843-05-6  | 326,4 | 458 | 7,0 | 0,04 | 2,301 |
| Derivados de benzotriazol | 2-(2'-hidroxi-5'-(2,4,4-trimetilpentilfenil))-benzotriazol (UV329) C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O 3147-75-9  | 323,4 | 472 | 6,2 | 0,17 | 3,767 |
| | 2-(3-terc-butil-2-hidroxi-5-metilfenil)-5-clorobenzotriazol (UV326) C ₁₇ H ₁₈ ClN ₃ O 3896-11-5  | 315,8 | 460 | 5,6 | 0,68 | 3,108 |

^aRoyal Society of Chemistry, 2015 - predicted using the ACD/Labs' ACD/PhysChem Suite; ^bUS Environmental Protection Agency's EPI Suite™, 2012; M - massa molar; PE - ponto de ebulição a 760 mmHg; K_{OW} - coeficiente de partilha octanol-água; s - solubilidade em água a 25 °C; BCF - fator de bioconcentração

Anexo 2 - Plantas dunares de Matosinhos e Gaia

As principais espécies de plantas dunares de Matosinhos e Vila Nova de Gaia encontram-se evidenciadas na Tabela A2.1 e apresentadas em imagens na Figura A2.1.

Tabela A2.1 - Caraterísticas da flora dunar de Matosinhos e Gaia (Correia & Fidalgo, 1995; Parque Biológico de Gaia, 2005)

| Espécie Nome comum | Ciclo de vida ^a | Habitat ^a | Caraterísticas globais ^a | Estudos de bioacumulação |
|---|----------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---|
| <i>Aetheorhiza bulbosa</i> (L.) Cass. Condriha de Dioscórides | Vivaz | Interior da duna frontal | Com rizoma e folhas obovada | |
| <i>Ammophila arenaria</i> (L.) Link Estorno | Vivaz | Topo da duna frontal | Rizomatosa de porte herbáceo | |
| <i>Anagallis monelli</i> L. Morrião azul | Vivaz | Locais secos das dunas interiores | Herbácea ou lenhosa | |
| <i>Artemisia crithmifolia</i> L. Madorneira | Vivaz | Dunas interiores | Lenhosa com caules aromáticos | |
| <i>Cakile maritima</i> Scop. Carqueja mansa ou eruca-marinha | Anual | Areias marítimas nitrificadas | Ramificada e carnuda | Cádmio (Taamalli <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>Calystegia soldanella</i> (L.) R. Br. Chapeleta ou couve marinha | Vivaz | Duna embrionária | Herbácea | |
| <i>Carpobrotus edulis</i> (L.) N. E. Br. Chorão | Vivaz | Areias das dunas | Quase arbustiva e folhas carnudas | |
| <i>Cerastium diffusum</i> Pers. | Anual | Areias fixas do interior da duna | Pelos glandulares | |
| <i>Cistus salviifolius</i> L. Sagão-mouro | Vivaz | Solos frescos de dunas interiores | Lenhosa, não viscosa | Elementos metálicos (Abreu <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>Corema álbum</i> L. Camarinha | Anual | Dunas estabilizadas | Flor branca em bola | |
| <i>Corynephorus canescens</i> (L.) Beauv. | Vivaz | Dunas | Forma tufo com colmos delgados | |
| <i>Crucianella maritima</i> L. Granza-marítima ou granza das praias | Vivaz | Duna frontal, areias e rochedos | Lenhosa e caules esbranquiçados | |
| <i>Cyperus capitatus</i> Vandelli Junça | Vivaz | Areias da duna interior | Rizomatosa de porte herbáceo | |
| <i>Daphne gnidium</i> L. Trovisco | Vivaz | Matos | Lenhosa | |
| <i>Elymus farctus</i> (Viv.) Melderis <i>ssp. boreoatlanticus</i> (Simonet & Guinochet) Melde Feno-das-areias | Vivaz | Duna embrionária | Rizomatosa com caules rígidos | |
| <i>Eryngium maritimum</i> L. Cardo-marítimo | Vivaz | Duna frontal | Herbácea e robusta | |
| <i>Euphorbia paralias</i> L. Morganheira-das-praias | Vivaz | Duna frontal voltada para o mar | Lenhosa e carnuda | |
| <i>Euphorbia portlandica</i> L. Mama-leite | Bienal | Face interior da duna frontal | Caules sem pelos | |
| <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don. Perpétua das areias | Vivaz | Dunas fixas interiores | Lenhosa e aromática | |
| <i>Herniaria ciliolata</i> Melderis subsp. <i>robusta</i> Chaudhri | Vivaz | Dunas interiores e rochas | Entrenós robustos e com pelos densos | |

^aGomes *et al.* (2002)

Tabela A2.1 - Características da flora dunar de Matosinhos e Gaia (Correia & Fidalgo, 1995; Parque Biológico de Gaia, 2005) (*continuação*)

| Espécie | Ciclo de vida ^a | Habitat ^a | Caraterísticas globais ^a | Estudos de bioacumulação |
|--|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--|
| <i>Honchenya peploides</i> (L.) Ehrh. Sapinho-da-praia | Vivaz | Duna embrionária com alta humidade | Carnuda e nitrófila | N5-(hidroximetil-2,5-di-hidro-2-furil)-l-aloy-hidroxi glutamina (Cérantola <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Jasione maritima</i> var. <i>sabularia</i> (Cout.) Sales & Hedge Jasione | Anual | Duna estabilizada | Flor branca ou rosada | |
| <i>Leontodon taraxacoides</i> (Vill.) Mérat Leituga dos montes | Bienal | Duna frontal e interior | Numerosos escapos | |
| <i>Malcolmia littorea</i> (L.) R. Br. Goivinho da praia | Vivaz | Zona abrigada da duna frontal | Lenhosa com ramos estéreis brancos | |
| <i>Medicago marina</i> L. Luzerna-das-praias | Vivaz | Dunas | Flor amarela | |
| <i>Otanthus maritimus</i> (L.) Hoffmanns Cordeirinhos-da-praia | Vivaz | Duna frontal | Robusta com pelos longos brancos | |
| <i>Pancratium maritimum</i> L. Narciso das areias ou lírio das areias | Vivaz | Duna frontal | Bolbosa | |
| <i>Plantago coronopus</i> L. Diabelha | Anual ou bienal | Dunas fixas interiores | Poucas rosetas de folhas | |
| <i>Polygonum maritimum</i> L. Polígono da praia ou corriola-marinha | Vivaz | Areias e cascalhos | Lenhosa na base e folhas carnudas | |
| <i>Rumex bucephalophorus</i> L. Azeda de cão | Anual ou bienal | Interior da duna frontal | Vários caules | |
| <i>Salsola kali</i> L. Barrilheira | Anual | Areias nitrificadas | Nitrófila | Cádmio (De La Rosa <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>Scrophularia frutescens</i> L. | Anual | Dunas | Vários ramos | |
| <i>Sedum acre</i> L. Uva de cão | Vivaz | Duna interior e terrenos pobres | Sem pelos | |
| <i>Seseli tortuosum</i> L. Caminho-de-Marselha | Vivaz | Rochas e areias das dunas interiores | Sem pelos e ramosa | |
| <i>Silene littorea</i> Brot. | Anual | Duna frontal | Pelos densos | |
| <i>Vulpia alopecuroides</i> (Schousboe) Dumort. Vúlpia | Anual | Duna interior | Forma tufo, folhas planas | |

^aGomes *et al.* (2002)



Figura A2.1 - Imagens das plantas dunares de Matosinhos e Vila Nova de Gaia (Gomes *et al.*, 2002).

Anexo 3 - Curvas de calibração

As curvas de calibração dos 12 *musks* sintéticos e dos 4 filtros-UV analisados encontram-se apresentados desde a Figura A3.1 até à Figura A3.16. Os pontos em que os compostos não foram detetados, foram eliminados. As equações e os parâmetros usados na avaliação da qualidade das retas de calibração estão presentes na Tabela A3.1.

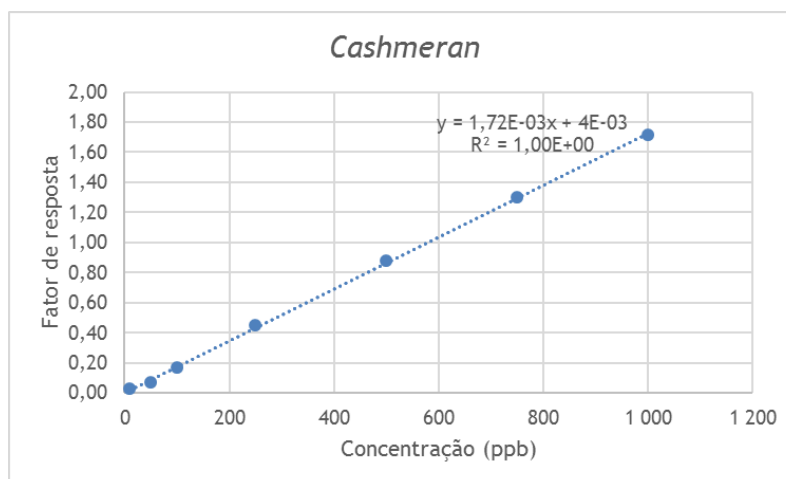


Figura A3.1 - Curva de calibração do musk cashmeran.

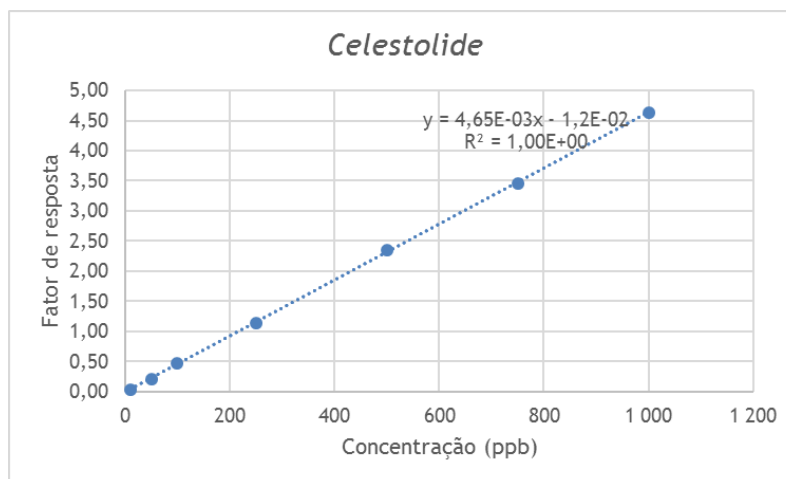


Figura A3.2 - Curva de calibração do musk celestolide.

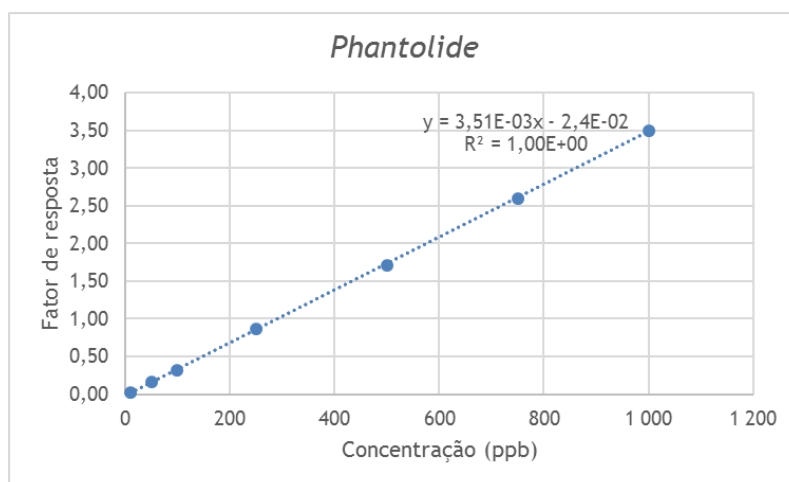


Figura A3.3 - Curva de calibração do *musk phantolide*.

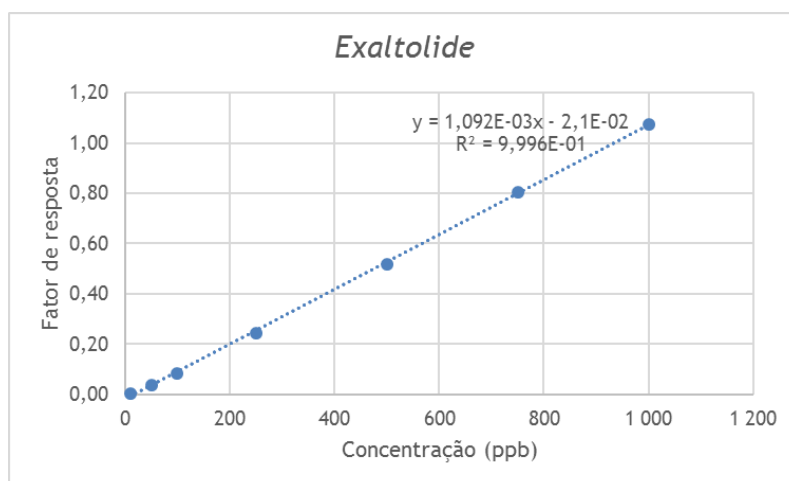


Figura A3.4 - Curva de calibração do *musk exaltolide*.

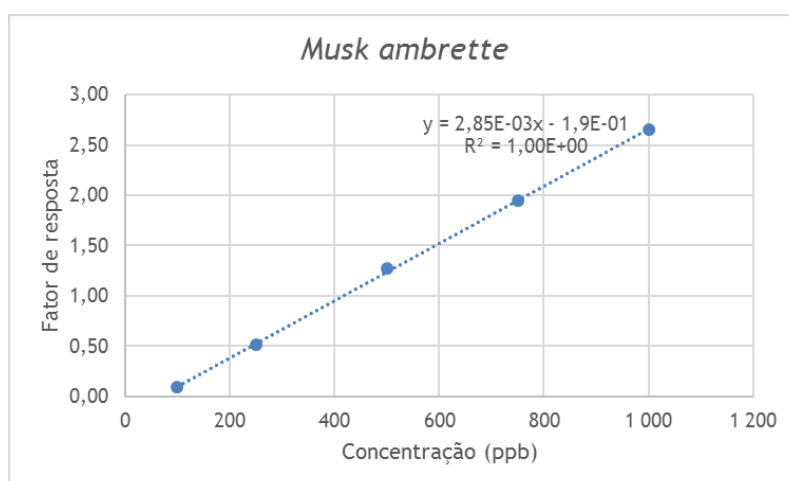


Figura A3.5 - Curva de calibração do *musk ambrette*.

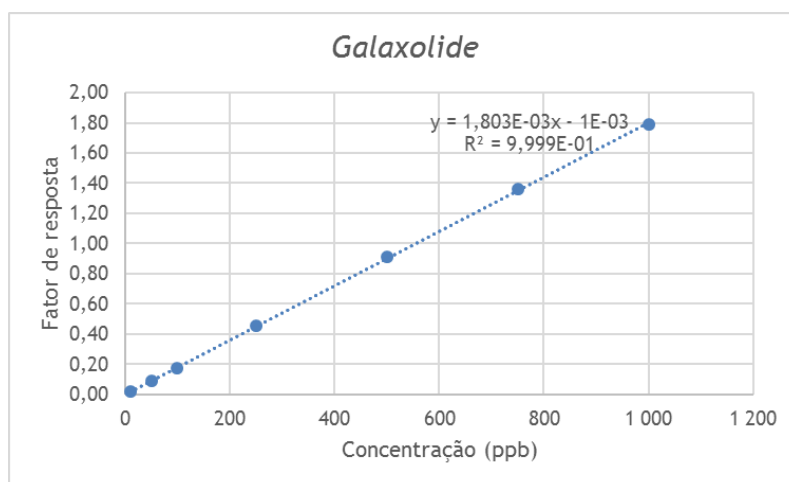


Figura A3.6 - Curva de calibração do *musk galaxolide*.

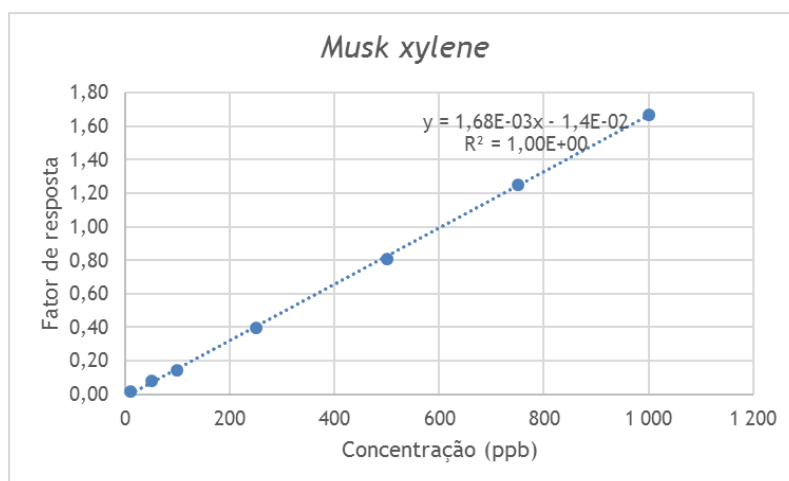


Figura A3.7 - Curva de calibração do *musk xylene*.

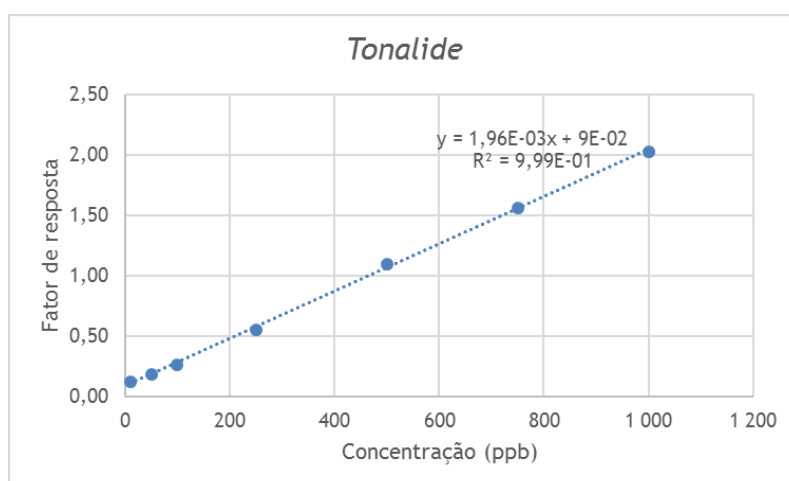


Figura A3.8 - Curva de calibração do *musk tonalide*.

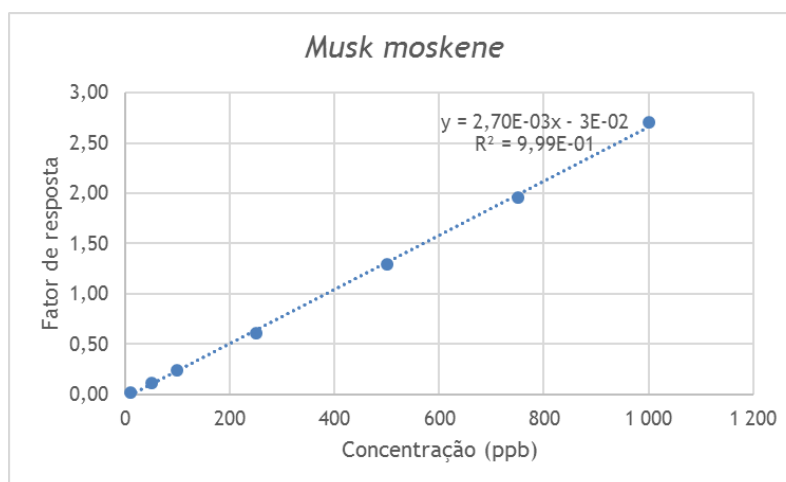


Figura A3.9 - Curva de calibração do *musk moskene*.

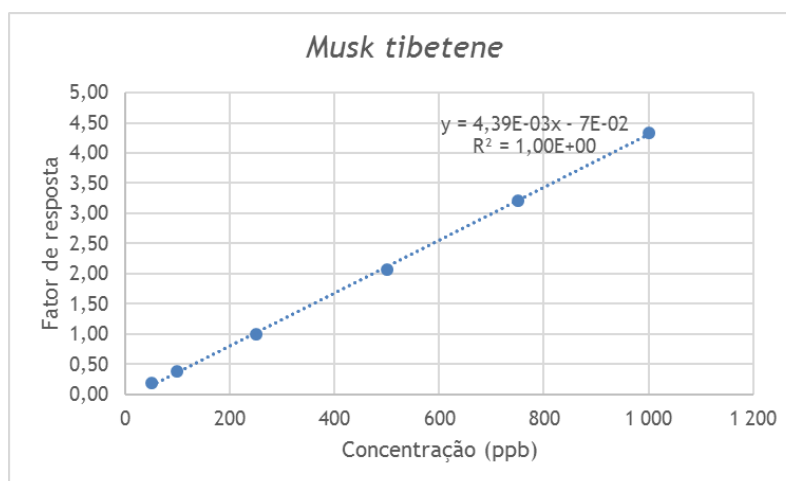


Figura A3.10 - Curva de calibração do *musk tibetene*.

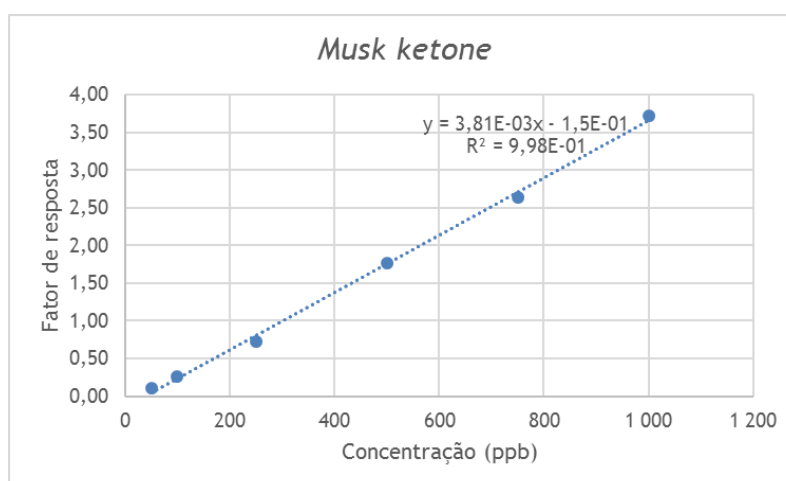


Figura A3.11 - Curva de calibração do *musk ketone*.

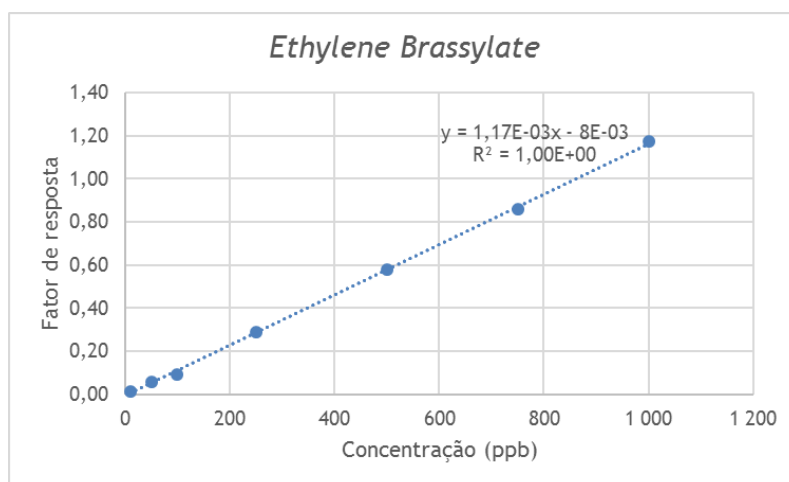


Figura A3.12 - Curva de calibração do musk ethylene brassylate.

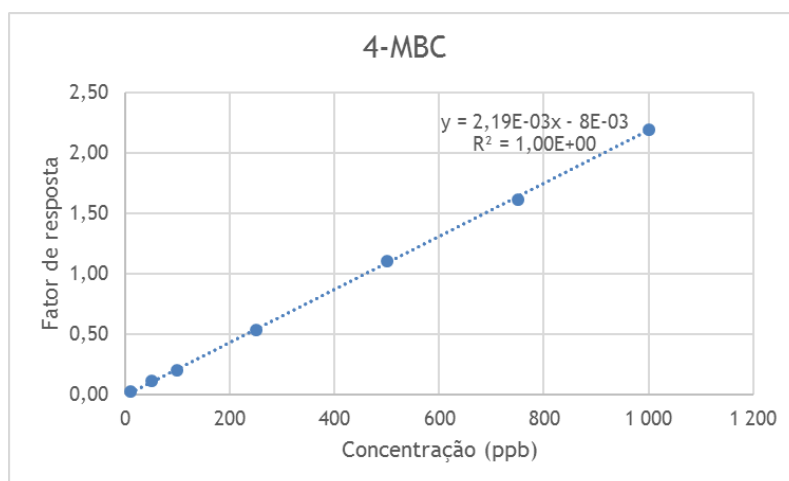


Figura A3.13 - Curva de calibração do filtro-UV 4-MBC.

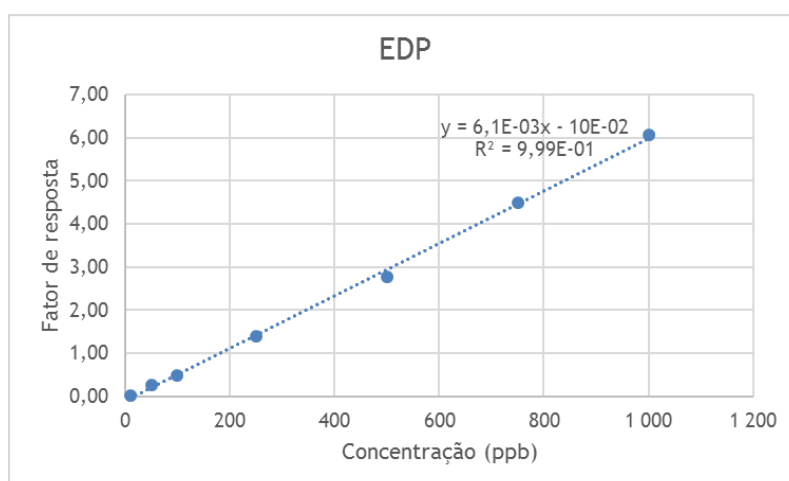


Figura A3.14 - Curva de calibração do filtro-UV EDP.

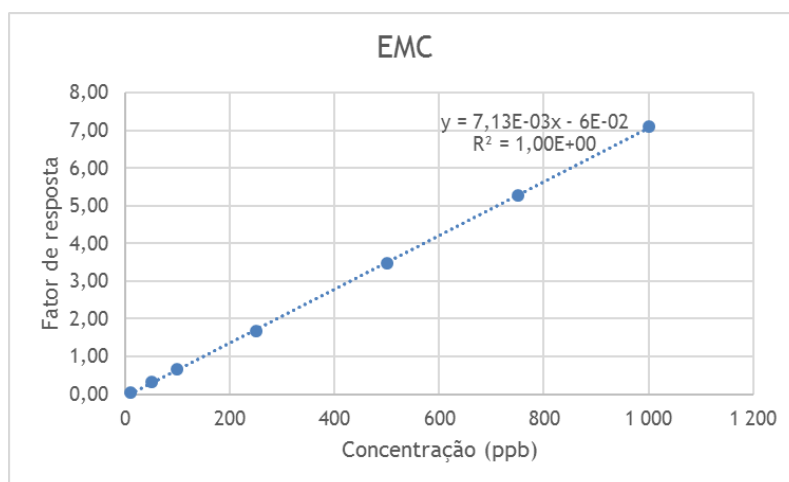


Figura A3.15 - Curva de calibração do filtro-UV EMC.

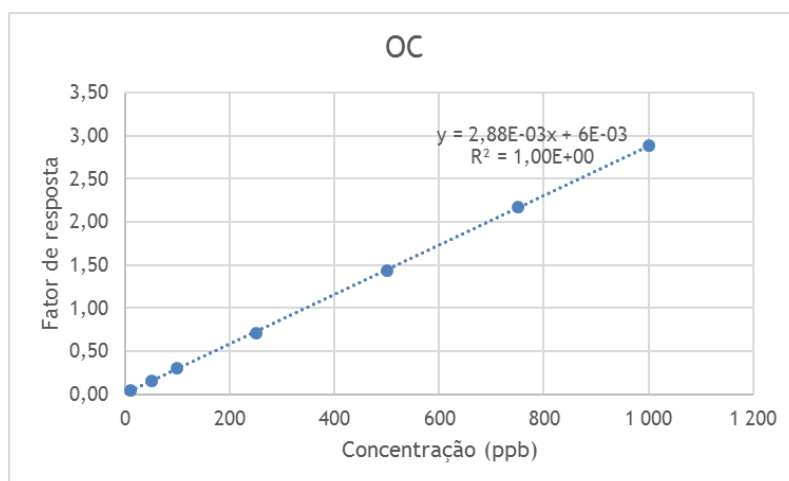


Figura A3.16 - Curva de calibração do filtro-UV OC.

Tabela A3.1 - Parâmetros de avaliação das curvas de calibração

| Compostos | Equação da curva de calibração ($y = ((a \pm s_a)x + (b \pm s_b))$) | r ($> 0,995$) | s_a/a ($< 5\%$) | $b-s_b$ ($b-s_b < 0 < b+s_b$) | $b+s_b$ |
|----------------------------|--|--------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| <i>Cashmeran</i> | $y = (1,72 \pm 0,01) \times 10^{-3}x + (4 \pm 7) \times 10^{-3}$ | 1,000 | 0,81% | -3×10^{-3} | 11×10^{-3} |
| <i>Celestolide</i> | $y = (4,65 \pm 0,02) \times 10^{-3}x + (-1,2 \pm 0,9) \times 10^{-2}$ | 1,000 | 0,38% | $-2,2 \times 10^{-2}$ | $-0,3 \times 10^{-2}$ |
| <i>Phantolide</i> | $y = (3,51 \pm 0,02) \times 10^{-3}x + (-2,4 \pm 0,8) \times 10^{-2}$ | 1,000 | 0,46% | $-3,2 \times 10^{-2}$ | $-1,5 \times 10^{-2}$ |
| <i>Exaltolide</i> | $y = (1,092 \pm 0,010) \times 10^{-3}x + (-2,1 \pm 0,5) \times 10^{-2}$ | 1,000 | 0,88% | $-2,6 \times 10^{-2}$ | $-1,6 \times 10^{-2}$ |
| <i>Musk ambrette</i> | $y = (2,85 \pm 0,03) \times 10^{-3}x + (-1,9 \pm 0,2) \times 10^{-1}$ | 1,000 | 0,96% | $-2,0 \times 10^{-1}$ | $-1,7 \times 10^{-1}$ |
| <i>Galaxolide</i> | $y = (1,803 \pm 0,008) \times 10^{-3}x + (-1 \pm 4) \times 10^{-3}$ | 1,000 | 0,44% | -5×10^{-3} | 3×10^{-3} |
| <i>Musk xylene</i> | $y = (1,68 \pm 0,01) \times 10^{-3}x + (-1,4 \pm 0,7) \times 10^{-2}$ | 1,000 | 0,84% | $-2,1 \times 10^{-2}$ | $-0,6 \times 10^{-2}$ |
| <i>Tonalide</i> | $y = (1,96 \pm 0,02) \times 10^{-3}x + (9 \pm 1) \times 10^{-2}$ | 1,000 | 1,20% | 7×10^{-2} | 10×10^{-2} |
| <i>Musk moskene</i> | $y = (2,70 \pm 0,03) \times 10^{-3}x + (-3 \pm 2) \times 10^{-2}$ | 1,000 | 1,26% | -5×10^{-2} | -2×10^{-2} |
| <i>Musk tibetene</i> | $y = (4,39 \pm 0,04) \times 10^{-3}x + (-7 \pm 3) \times 10^{-2}$ | 1,000 | 1,02% | -10×10^{-2} | -5×10^{-2} |
| <i>Musk ketone</i> | $y = (3,81 \pm 0,08) \times 10^{-3}x + (-1,5 \pm 0,5) \times 10^{-1}$ | 0,999 | 2,16% | $-1,9 \times 10^{-1}$ | $-1,0 \times 10^{-1}$ |
| <i>Ethylene Brassylate</i> | $y = (1,17 \pm 0,01) \times 10^{-3}x + (-8 \pm 6) \times 10^{-3}$ | 1,000 | 1,00% | -14×10^{-3} | -2×10^{-3} |
| 4-MBC | $y = (2,19 \pm 0,02) \times 10^{-3}x + (-8 \pm 9) \times 10^{-3}$ | 1,000 | 0,76% | -17×10^{-3} | $0,2 \times 10^{-3}$ |
| EDP | $y = (6,1 \pm 0,1) \times 10^{-3}x + (-10 \pm 5) \times 10^{-2}$ | 0,999 | 1,64% | -15×10^{-2} | -5×10^{-2} |
| EMC | $y = (7,13 \pm 0,04) \times 10^{-3}x + (-6 \pm 2) \times 10^{-2}$ | 1,000 | 0,62% | -8×10^{-2} | -4×10^{-2} |
| OC | $y = (2,88 \pm 0,01) \times 10^{-3}x + (6 \pm 6) \times 10^{-3}$ | 1,000 | 0,37% | $0,1 \times 10^{-3}$ | 11×10^{-3} |

y - fator de resposta; x - concentração; a - declive; b - ordenada na origem; s_a - desvio-padrão do declive; s_b - desvio-padrão da ordenada na origem; r - coeficiente de correlação; s_a/a - desvio-padrão relativo do declive

Anexo 4 - Cromatogramas

A Figura A4.1 apresenta um exemplo de um cromatograma obtido de um padrão de calibração a 750 µg/L. Os cromatogramas da Figura A4.2 até à Figura A4.11 são exemplos obtidos de amostras reais de cada uma das espécies vegetais, com (45 ng/g) e sem *spike*.

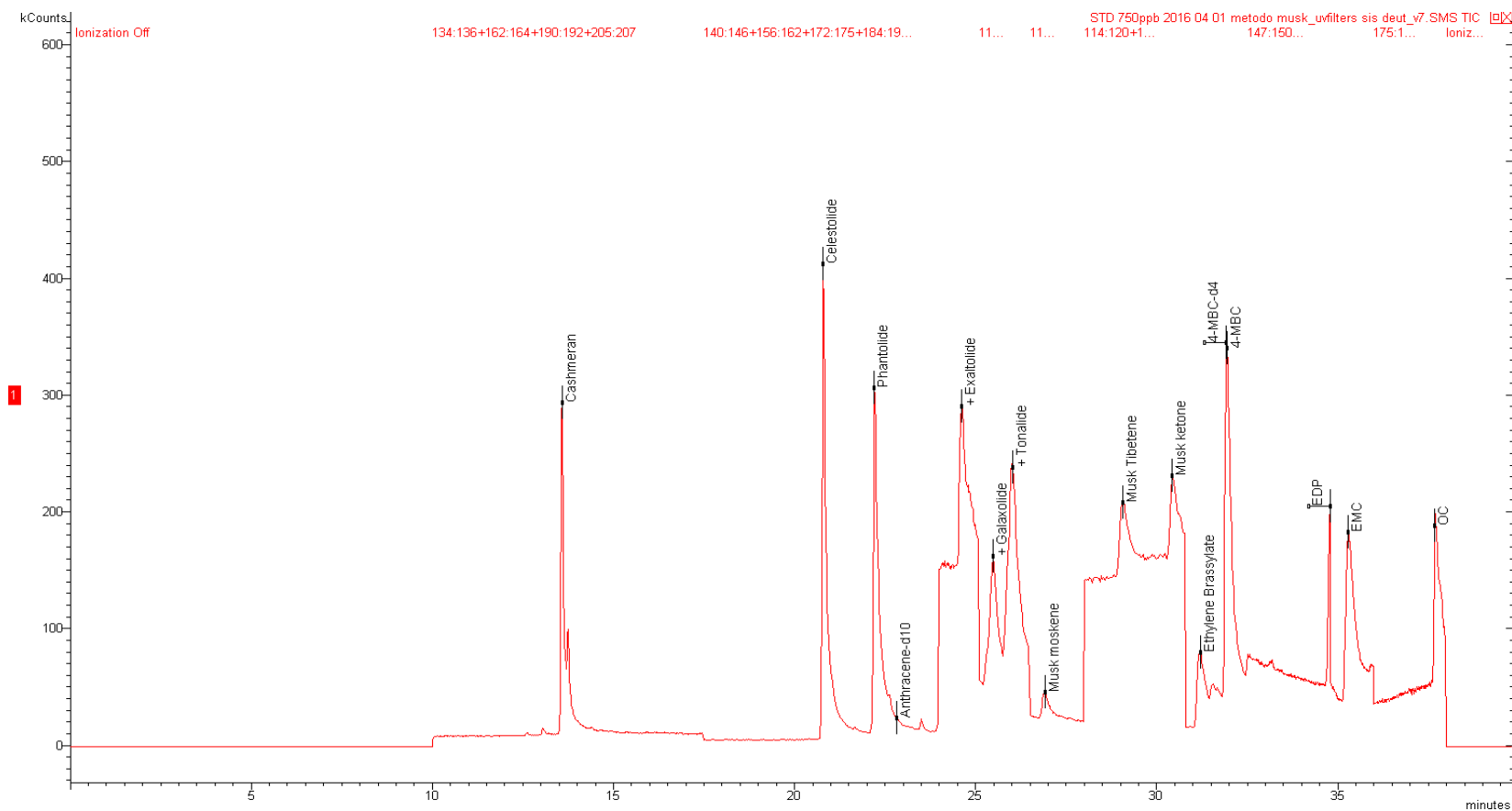


Figura A4.1 - Cromatograma em modo SIS do padrão de calibração a 750 µg/L.

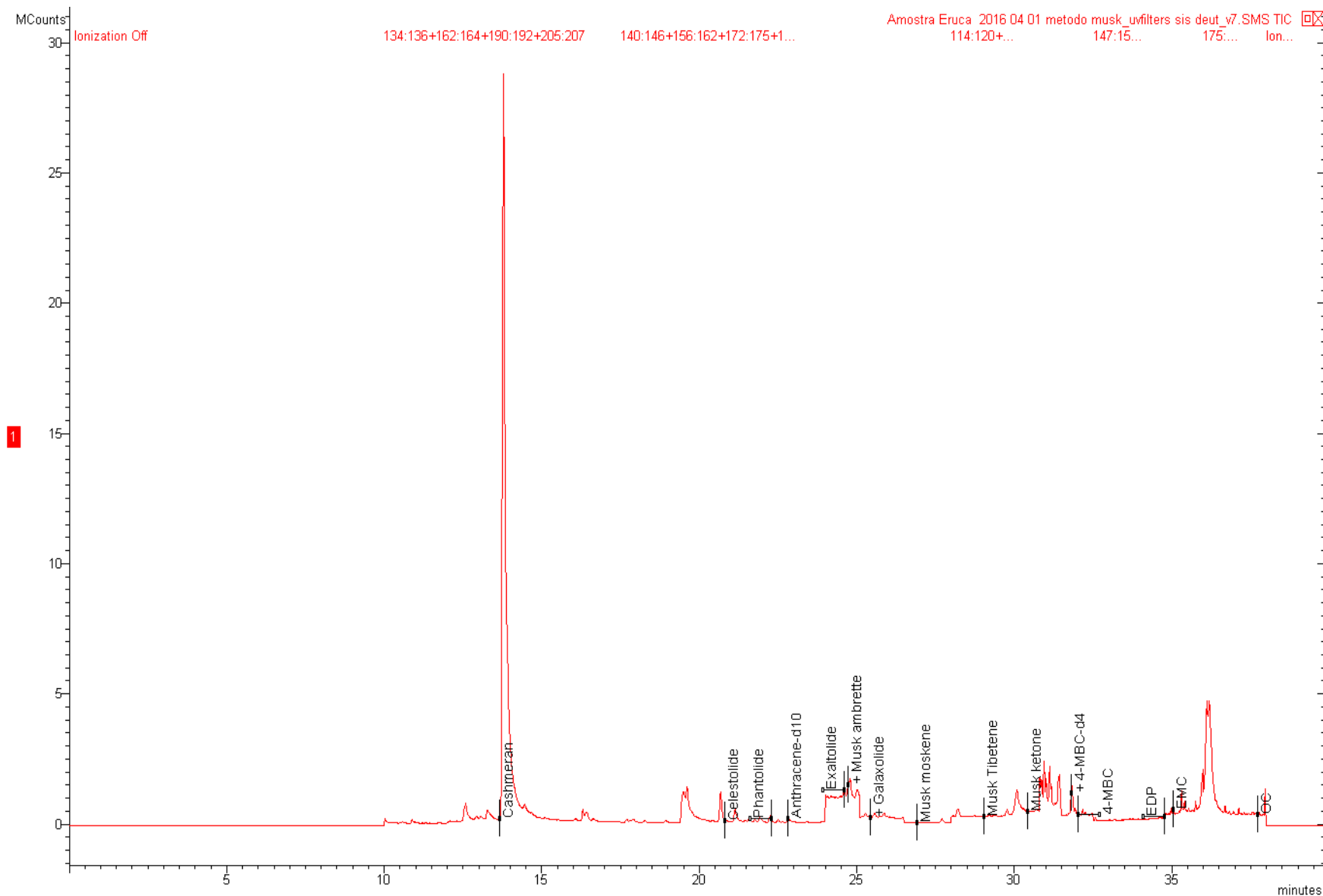


Figura A4.2 - Cromatograma em modo SIS da amostra de eruca.

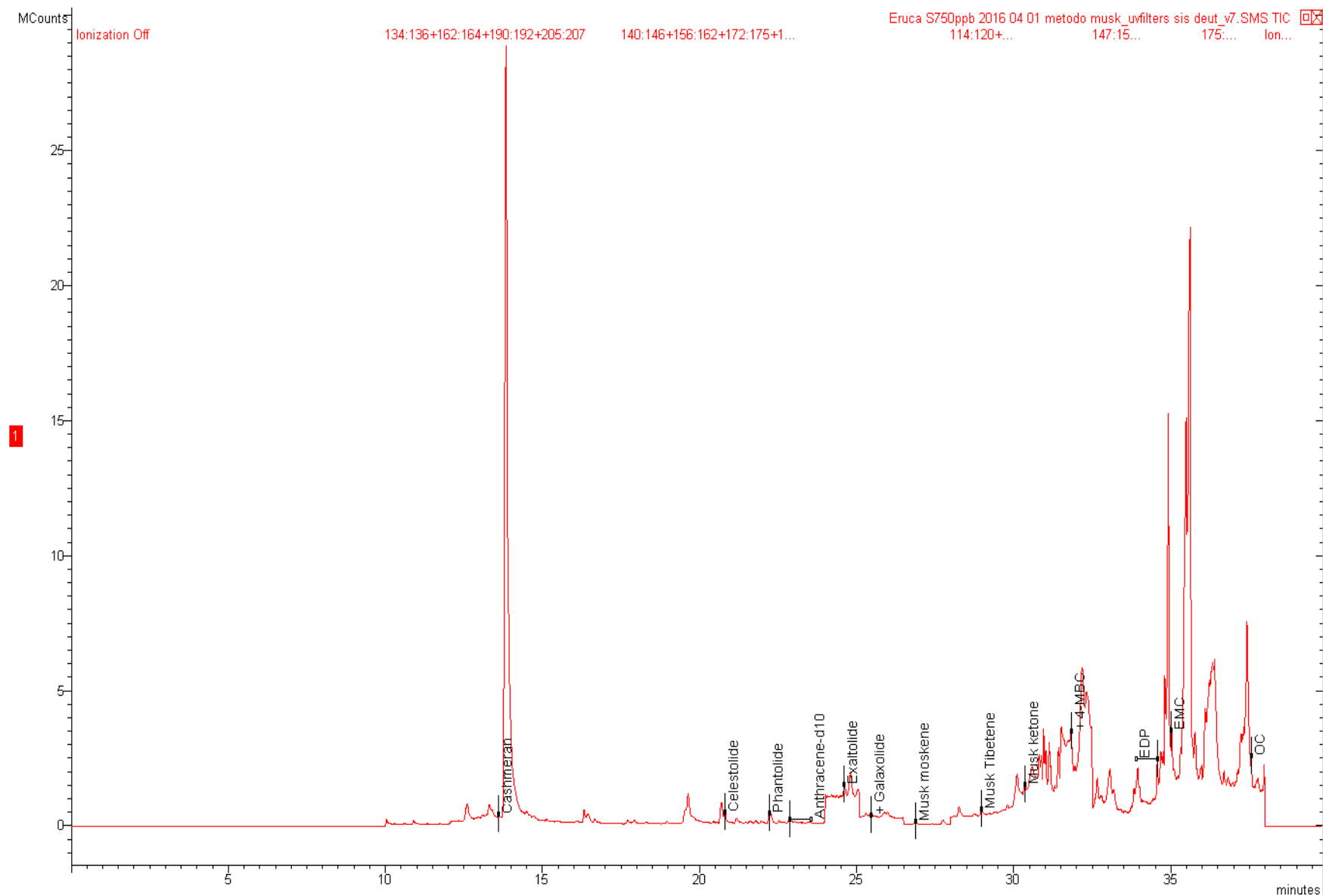


Figura A4.3 - Cromatograma em modo SIS da amostra de eruca com *spike* de 45 ng/g.

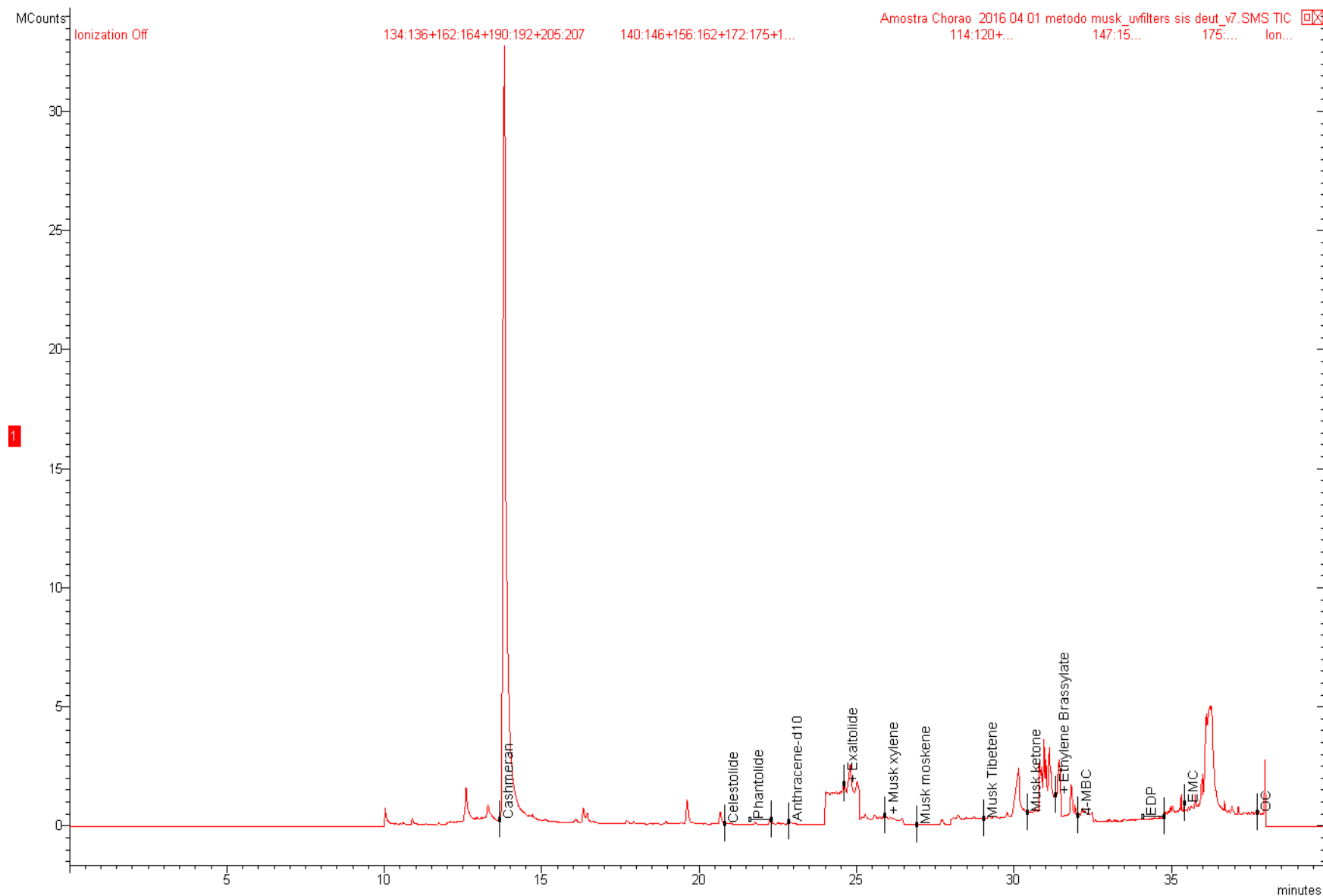


Figura A4.4 - Cromatograma em modo SIS da amostra de chorão.

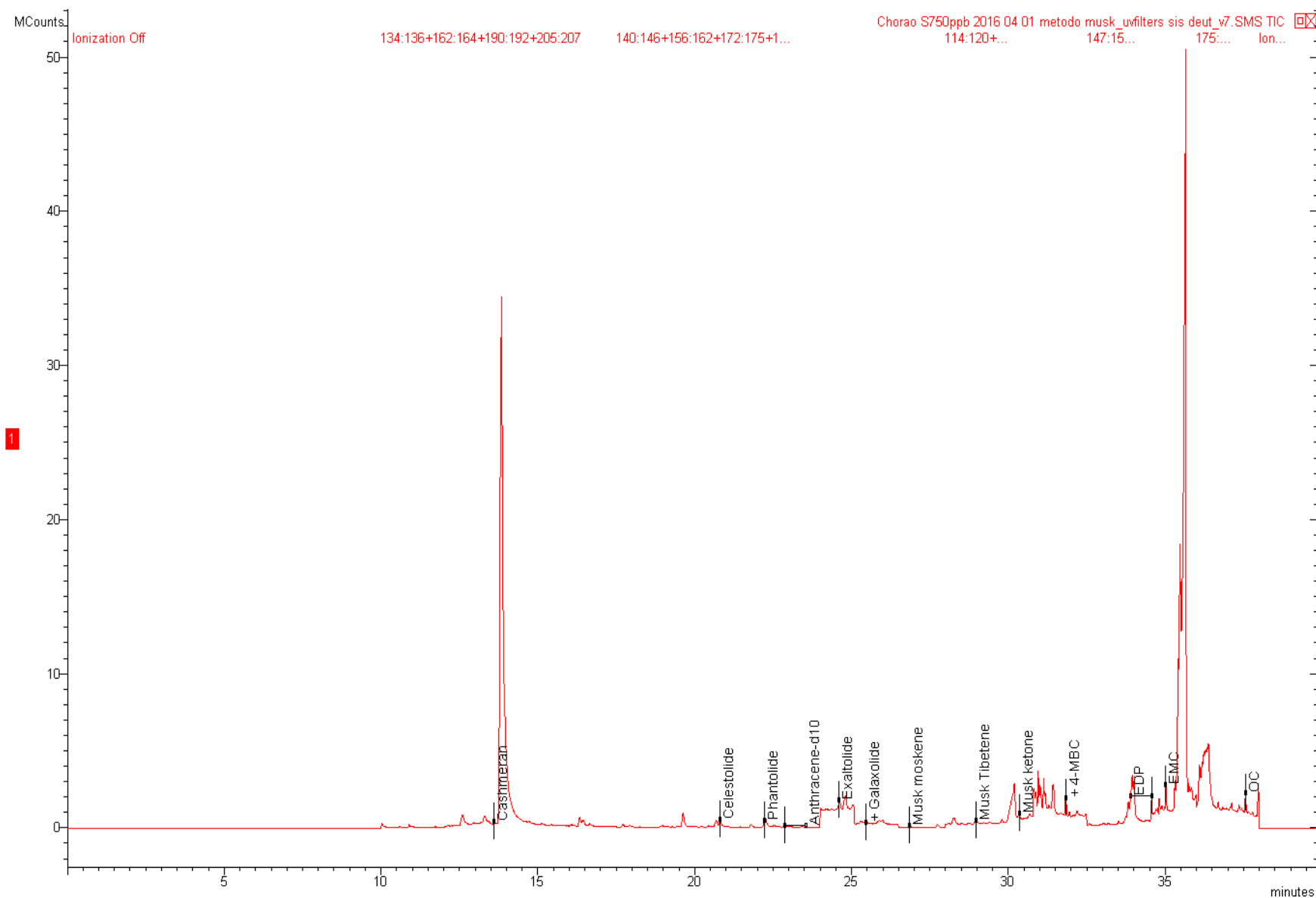


Figura A4.5 - Cromatograma em modo SIS da amostra de chorão com *spike* de 45 ng/g.

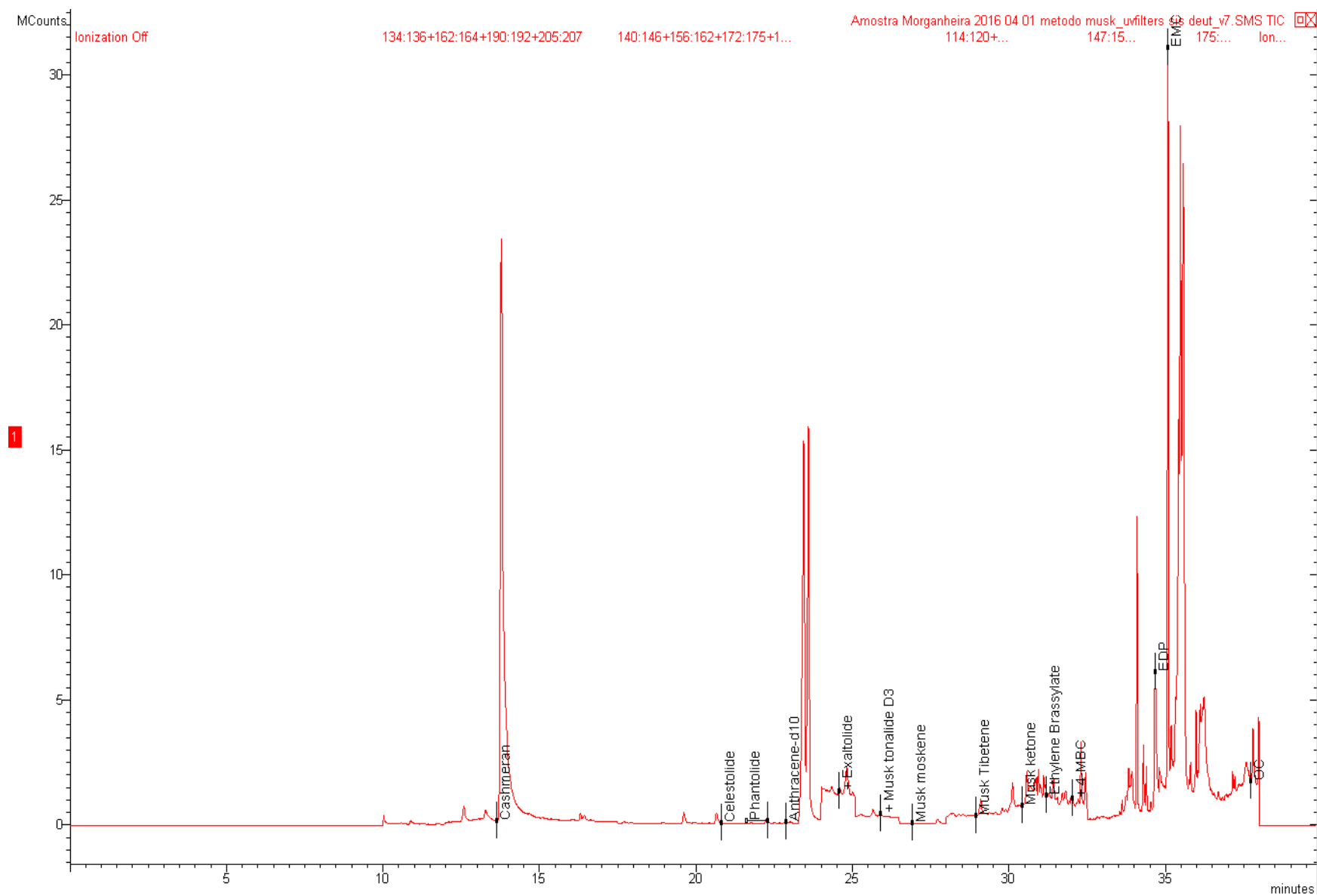


Figura A4.6 - Cromatograma em modo SIS da amostra de morganheira.

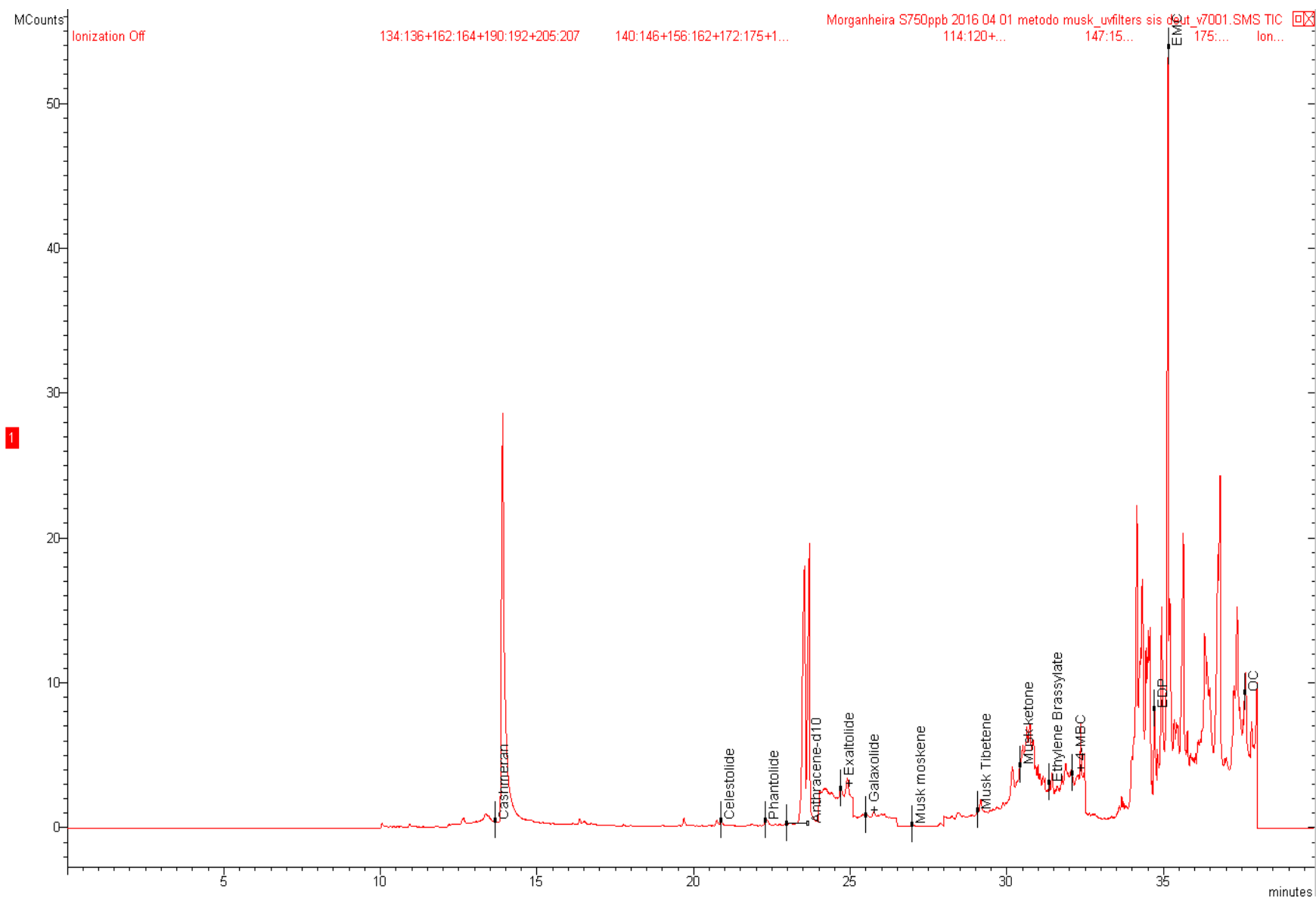


Figura A4.7 - Cromatograma em modo SIS da amostra de morganheira com *spike* de 45 ng/g.

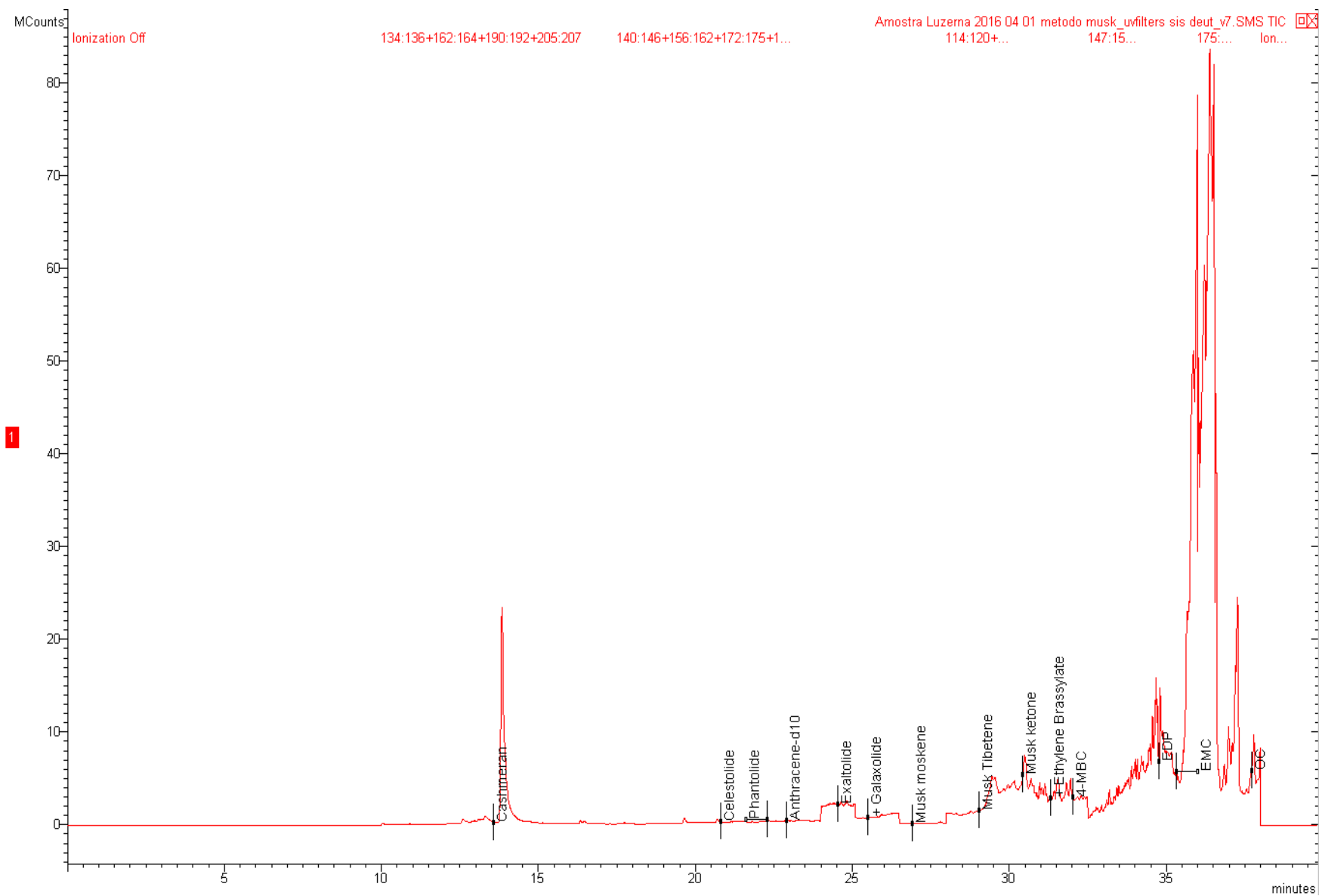


Figura A4.8 - Cromatograma em modo SIS da amostra de luzerna.

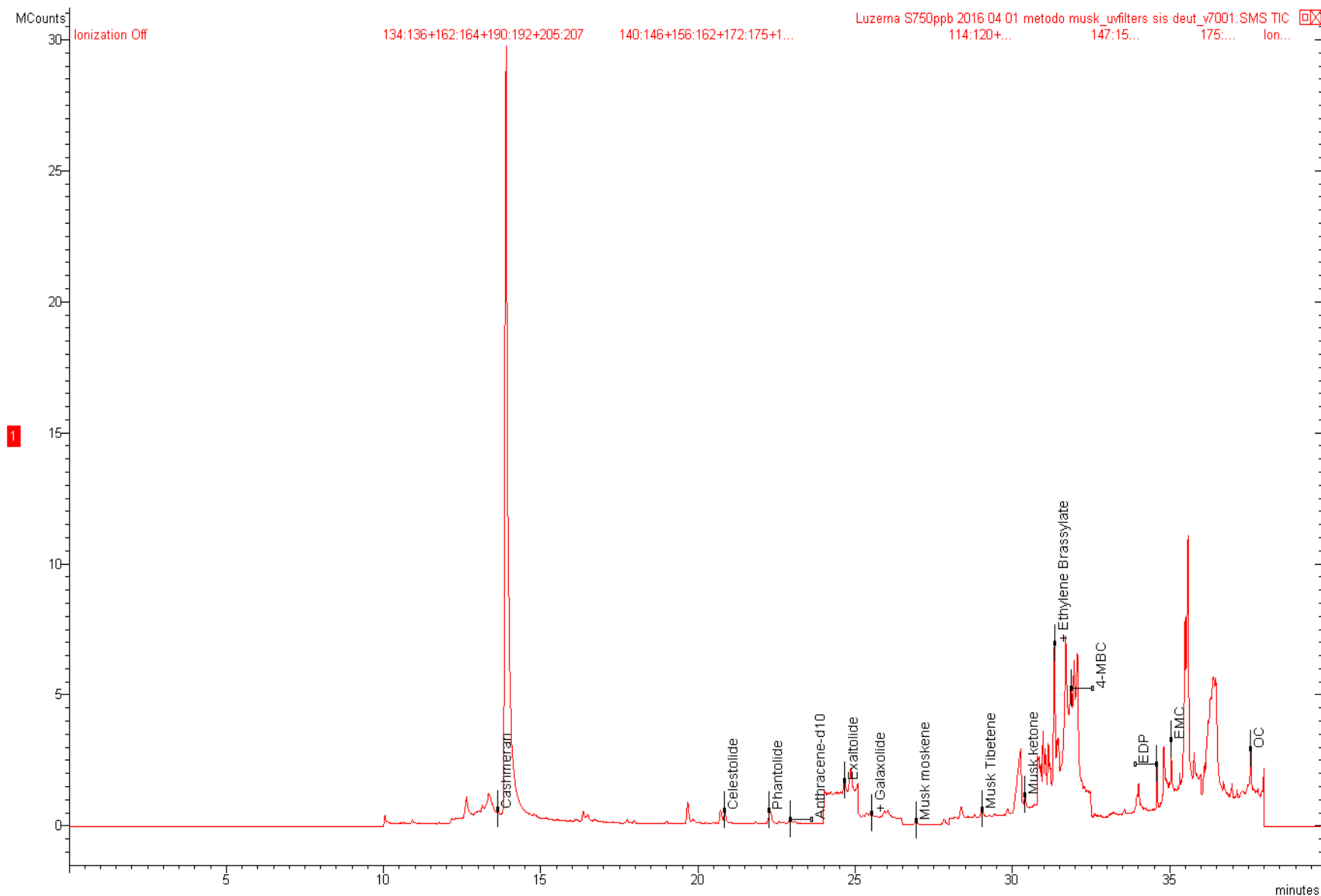


Figura A4.9 - Cromatograma em modo SIS da amostra de luzerna com *spike* de 45 ng/g.

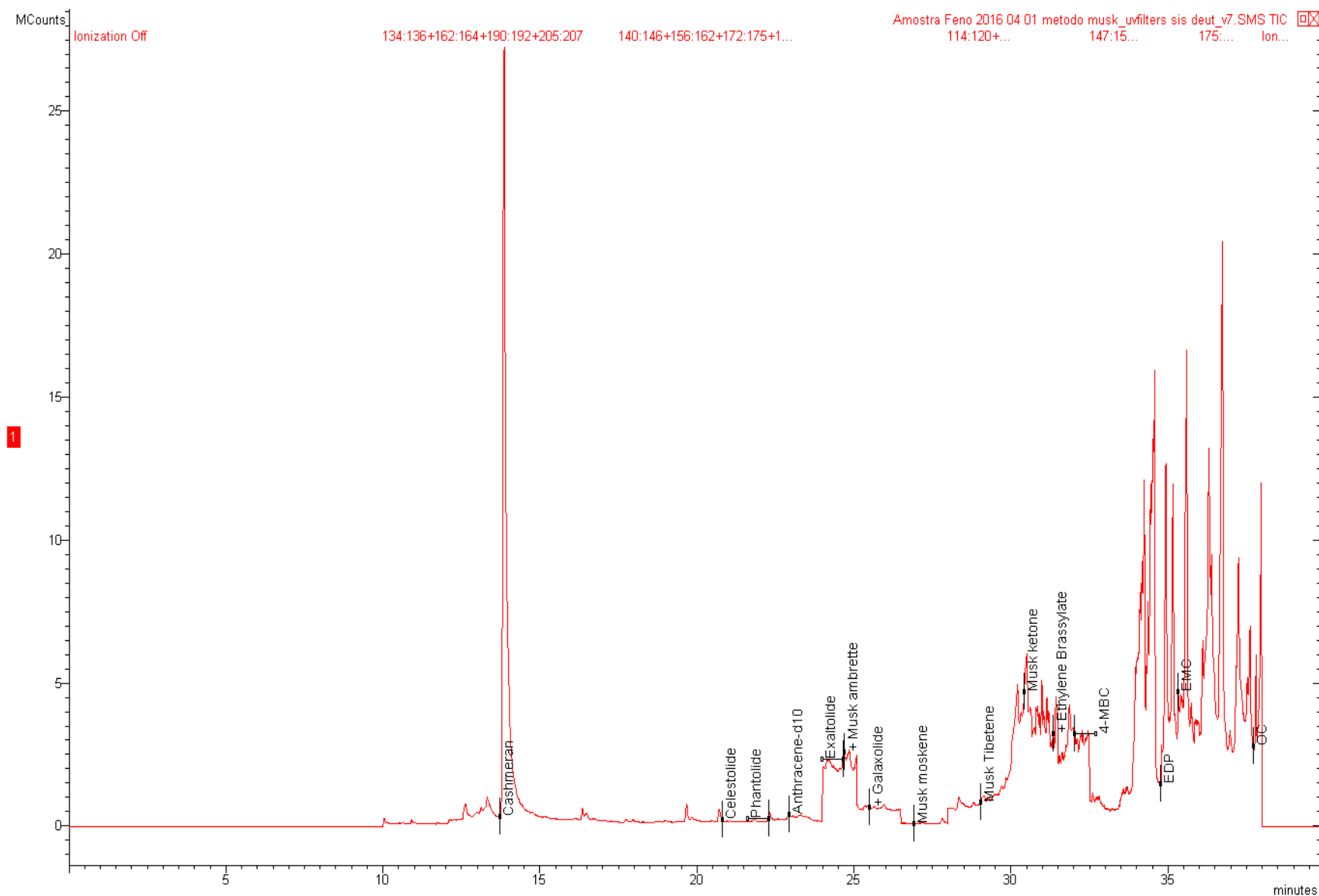


Figura A4.10 - Cromatograma em modo SIS da amostra de feno.

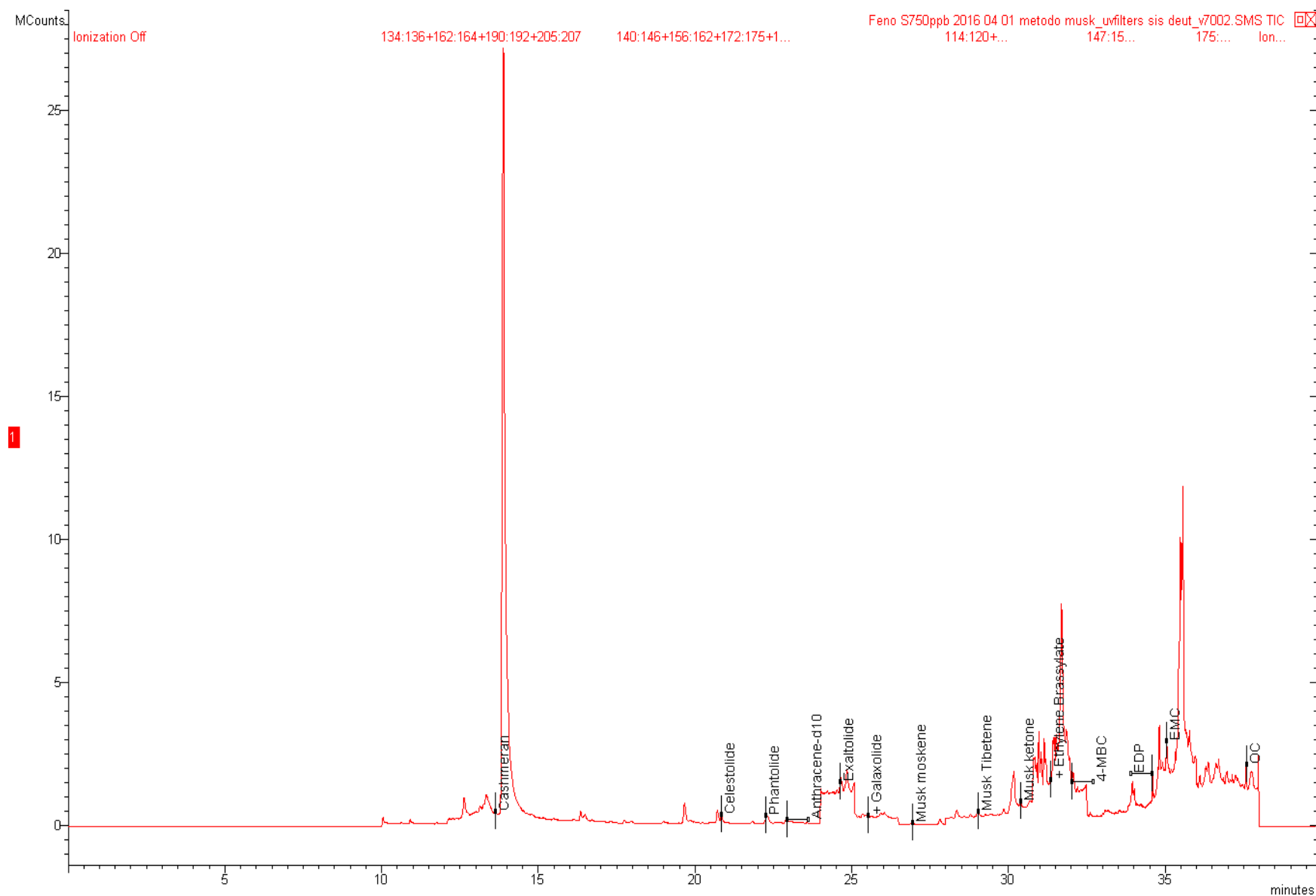


Figura A4.11 - Cromatograma em modo SIS da amostra de feno com *spike* de 45 ng/g.